



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**Validação de procedimento analítico empregando SPE e GC-ECD para  
determinação de pesticidas organoclorados em água e avaliação da  
permeabilidade destes nos dialisadores utilizados em hemodiálise**

**Aline Machado Maroneze**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2004**

**Validação de procedimento analítico empregando SPE e  
GC-ECD para determinação de pesticidas organoclorados em  
água e avaliação da permeabilidade destes nos dialisadores  
utilizados em hemodiálise**

por

**Aline Machado Maroneze**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área  
de Concentração em Química Analítica da Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**MESTRE EM QUÍMICA**

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Naturais e Exatas**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**Validação de procedimento analítico empregando SPE e  
GC-ECD para determinação de pesticidas organoclorados em  
água e avaliação da permeabilidade destes nos dialisadores  
utilizados em hemodiálise**

elaborada por

**Aline Machado Maroneze**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador**  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

---

**Profª Drª Rosana de Cassia de Souza Schneider**  
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

---

**Profª Drª Martha Bohrer Adaime**  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Santa Maria, 27 de agosto de 2004

*Se vencemos, Alguém esteve conosco. Se nada conseguimos, Ele continua junto de nós. Se persistimos, vemos realmente que Quem nos fez continuar, sorrirá para nós, mesmo que Dele, na felicidade, nos tenhamos esquecido.*

*À minha família.*

*Vocês abriram as portas do meu futuro e iluminaram o meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus. Hoje, procuro entre as palavras àquelas que seus corações devem ouvir: muito obrigada por tudo, amo vocês!*

*Herison.*

*Talvez você nem calcule o alcance de suas palavras e a força de sua presença junto de mim. Obrigada por ter acreditado que eu seria capaz de chegar ao final desta etapa e por acreditar que ainda chegarei a ser mais do que sonho. Te amo infinito.*

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xiv
RESUMO... ..	xvi
ABSTRACT .....	xviii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Fisiologia renal.....	4
2.2 Diálise peritoneal .....	4
2.3 Hemodiálise .....	5
2.3.1 Dialisador ou membrana de diálise .....	7
2.3.2 Problemas relacionados à água utilizada em hemodiálise .....	8
2.4 Pesticidas .....	9
2.4.1 Contaminação por resíduos de pesticidas.....	10
2.4.2 Persistência e efeitos cumulativos dos pesticidas organoclorados .....	10
2.4.3 Propriedades químicas dos pesticidas organoclorados .....	13
2.5 Pesticidas avaliados .....	14
2.6 Determinação de pesticidas organoclorados em águas utilizando SPE .....	18
2.7 Parâmetros cromatográficos.....	22
2.7.1 Fator de retenção (k).....	23
2.7.2 Resolução (Rs).....	23
2.7.3 Fator de separação ( $\alpha$ ).....	24
2.7.4 Curva de van Deemter .....	24

2.8 Validação de procedimentos analíticos.....	25
2.8.1 Curva analítica e linearidade.....	26
2.8.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	27
2.8.3 Recuperação .....	28
2.8.4 Precisão .....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Reagentes e solventes .....	31
3.2 Equipamentos e materiais .....	31
3.3 Gases empregados no Cromatógrafo a Gás .....	32
3.4 Limpeza do material utilizado .....	33
3.5 Pesticidas selecionados e preparo das soluções .....	33
3.6 Seleção do Padrão Interno .....	35
3.7 Estudo das condições cromatográficas .....	35
3.7.1 Estudo da vazão ótima do gás de arraste .....	35
3.7.2 Condições de operação do detector ECD .....	36
3.7.3 Sistema de injeção .....	36
3.7.4 Coluna cromatográfica e programa de temperatura do forno da coluna .....	36
3.7.5 Avaliação da separação cromatográfica.....	38
3.8 Otimização do método de extração e pré-concentração dos pesticidas empregando SPE .....	38
3.8.1 Descrição do método de extração/pré-concentração .....	41
3.9 Teste em branco .....	41
3.10 Validação do procedimento.....	41
3.10.1 Curva analítica e linearidade.....	42
3.10.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	42
3.10.3 Recuperação .....	42
3.10.4 Repetitividade.....	43
3.10.5 Precisão intermediária.....	43
3.11 Aplicação do procedimento .....	44
3.11.1 Procedimento de diálise realizado .....	45



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1 Teste em branco .....	48
4.2 Avaliação das condições cromatográficas .....	48
4.2.1 Seleção do padrão interno .....	49
4.2.2 Escolha da vazão ótima do gás de arraste .....	50
4.2.3 Avaliação da separação cromatográfica.....	50
4.3 Avaliação da etapa de extração.....	51
4.3.1 Escolha do solvente para eluição.....	51
4.3.2 Escolha do melhor cartucho para pré-concentração .....	55
4.4 Validação do procedimento desenvolvido.....	57
4.4.1 Curva analítica .....	57
4.4.2 Linearidade .....	58
4.4.3.Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	58
4.4.4 Repetitividade e precisão intermediária .....	59
4.4.5 Recuperação .....	61
4.5 Aplicação do procedimento desenvolvido.....	62
5 CONCLUSÕES .....	68
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	70
8 APÊNDICES .....	77

## AGRADECIMENTOS

Ao ensino público e de qualidade oferecido pela UFSM.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, pela orientação.

Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Martha Bohrer Adaime e Rosana de Cassia Schneider pelas sugestões e incentivos dados como banca examinadora da Defesa de Dissertação.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel pela participação como banca examinadora do Exame de Qualificação e pelo apoio enquanto colega.

À Prof<sup>a</sup>. MSc. Ionara Regina Pizzutti pela força e ensinamentos.

Aos funcionários e professores da UFSM que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

Aos colegas do LARP, em especial aos que se tornaram grandes amigos, Márcia e Fábio, pelos auxílios técnicos e acima de tudo, pela convivência fora do laboratório.

À minha grande amiga Karine, pela constante dedicação, obrigada pela sua amizade e pelas longas conversas de desabafo.

À Emi, por tudo que representou neste tempo, sempre presente com seu ombro amigo.

Às amigas Martinha e Paula, pela força, carinho e amizade.

À Deus, por mais esta conquista.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Características físico-químicas dos pesticidas avaliados.....	16
<b>Tabela 2.</b> Limite máximo de resíduo dos pesticidas avaliados, em água potável, segundo a legislação brasileira.....	17
<b>Tabela 3.</b> Princípios ativos com os respectivos graus de pureza, massas e volumes utilizados para o preparo das soluções estoque em n-hexano (todas as soluções com concentrações finais de 1000 mg L <sup>-1</sup> ).....	33
<b>Tabela 4.</b> Preparo das soluções analíticas, em acetato de etila, obtidas a partir da solução analítica nº 3 (0,1 mg L <sup>-1</sup> ).....	34
<b>Tabela 5.</b> Programas de temperatura do forno da coluna utilizados na otimização da separação cromatográfica.....	37
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros cromatográficos $t_R$ , $t_R'$ , $k$ , $R_s$ e $\alpha$ obtidos para a separação da mistura dos compostos e PI, empregando a solução analítica nº 3.....	51
<b>Tabela 7.</b> Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:acetona para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).....	52
<b>Tabela 8.</b> Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:acetato de etila para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).....	53
<b>Tabela 9.</b> Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:isooctano para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).....	54
<b>Tabela 10.</b> Resultados referentes ao teste para determinação da quantidade necessária de material adsorvente C18-E para a extração/pré-concentração dos pesticidas.....	56

<b>Tabela 11.</b> Curvas analíticas e coeficientes de determinação obtidos para os princípios ativos preparados em acetato de etila .....	57
<b>Tabela 12.</b> Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental ( $LOD_i$ e $LOQ_i$ ), LOQ do procedimento ( $LOQ_p$ ) e limites estabelecidos pela legislação brasileira.....	58
<b>Tabela 13.</b> Resultados de precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pii}$ ) do instrumento .....	59
<b>Tabela 14.</b> Resultados de recuperação e precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{rp}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pip}$ ) do procedimento .....	60
<b>Tabela 15.</b> Resultados (em $ng L^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de $2 \mu g L^{-1}$ (Experimento 1).....	62
<b>Tabela 16.</b> Resultados (em $ng L^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de $20 \mu g L^{-1}$ (Experimento 2).....	63
<b>Tabela 17.</b> Resultados (em $ng L^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de $2 \mu g L^{-1}$ (Experimento 3).....	64
<b>Tabela 18.</b> Resultados (em $ng L^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de $20 \mu g L^{-1}$ (Experimento 4).....	65

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Esquema do processo de hemodiálise.....	6
<b>Figura 2.</b> Máquina de hemodiálise.....	6
<b>Figura 3.</b> Detalhes dos dialisadores utilizados em hemodiálise: (a) dialisador; (b) dialisador aberto mostrando os capilares que o constituem; (c) foto ampliada dos capilares.....	7
<b>Figura 4.</b> Fórmulas estruturais dos pesticidas que fizeram parte deste trabalho. ....	15
<b>Figura 5.</b> Diagrama demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ.....	28
<b>Figura 6.</b> Sistema SPE utilizado para pré-concentração das amostras.....	39
<b>Figura 7.</b> Princípio de operação do sistema SPE .....	40
<b>Figura 8.</b> Sistema de diálise utilizado para os estudos em escala laboratorial .....	44
<b>Figura 9.</b> Cromatograma do teste em branco.....	48
<b>Figura 10.</b> Cromatograma da solução analítica nº 6, em acetato de etila (5 µg L <sup>-1</sup> ) contendo os cinco pesticidas organoclorados em estudo e o PI selecionado (aldrin).....	49
<b>Figura 11.</b> Curva de van Deemter para escolha da vazão ótima do gás de arraste, utilizando os valores encontrados para o α-endosulfan .....	50
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de amostra fortificada ao nível de 0,1 µg L <sup>-1</sup> contendo os cinco pesticidas organoclorados em estudo e o padrão interno .....	61
<b>Figura 13.</b> Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 2, diálise II, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de 20 µg L <sup>-1</sup> ) .....	64
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 3, diálise II, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de 2 µg L <sup>-1</sup> ) .....	66
<b>Figura 15.</b> Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 4, diálise III, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de 20 µg L <sup>-1</sup> ) .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  – Fator de separação

$\mu$  – Vazão ótima do gás de arraste

a – Coeficiente angular

b – Coeficiente linear

C8 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C8

C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18

DDE – Diclorodifenildicloroetano

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

d.i. – Diâmetro interno

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography – Electron Capture Detection*

H – Altura equivalente a um prato

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k – Fator de retenção

L – Comprimento da coluna cromatográfica

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

N – Eficiência da coluna cromatográfica

PAHs – hidrocarbonetos poliaromáticos, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

PCBs – bifenilas policloradas, do inglês *Polychlorinated Biphenyls*

PI – Padrão Interno

Q – Concentração

- $r$  – Coeficiente de correlação
- $r^2$  – Coeficiente de determinação
- R – Recuperação
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada, em termos da legislação brasileira
- Rs – Resolução
- RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
- $RSD_r$  – Desvio padrão relativo para repetitividade
- $RSD_{ri}$  – Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento
- $RSD_{rp}$  – Desvio padrão relativo para repetitividade do procedimento
- $RSD_{pi}$  – Desvio padrão relativo para precisão intermediária
- $RSD_{pii}$  – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento
- $RSD_{pip}$  – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do procedimento
- S – Sinal
- SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
- $t_R$  – Tempo de retenção de um analito
- $t_M$  – Tempo de saída de uma analito não retido
- $t'_R$  – Tempo de retenção ajustado
- u.r. – Unidades de resposta
- x – Concentração do composto em estudo
- $x_i$  – Valores individuais
- $W_b$  – Largura do pico na base
- $W_h$  – Largura do pico à meia altura
- y – Resposta do detector (altura ou área do pico)

## RESUMO

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM

### VALIDAÇÃO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO EMPREGANDO SPE E GC-ECD PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EM ÁGUA E AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DESTES NOS DIALISADORES UTILIZADOS EM HEMODIÁLISE

Autora: Aline Machado Maroneze  
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella  
Santa Maria, 27 de agosto de 2004

A diálise do sangue, cuja modalidade mais empregada é a hemodiálise, é um método amplamente usado para o tratamento da insuficiência renal. Com este tratamento são removidas substâncias tóxicas que se acumulam no paciente e que não foram eliminadas pela urina. O processo ocorre em um “rim artificial” (dialisador) que é constituído de um conjunto de finos capilares com paredes semipermeáveis. O sangue passa pelo interior destes capilares e pelo exterior, em sentido contrário, passa a solução de diálise (uma solução salina diluída em água).

O volume de água usado em cada sessão de hemodiálise é cerca de 120 L por paciente. Se a água utilizada não for monitorada, poluentes poderão ter efeitos cumulativos no paciente, dentre os quais encontram-se os pesticidas organoclorados.



Com este trabalho, foi desenvolvido e validado um procedimento analítico para a determinação de baixas concentrações de cinco pesticidas organoclorados ( $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan, DDE, DDT e endrin) em água, utilizando Extração em Fase Sólida para a pré-concentração e a Cromatografia a Gás com Detecção por Captura de Elétrons para a determinação dos pesticidas. Foram realizados testes para otimizar o método de pré-concentração nos quais cartuchos de C18-E contendo 500 mg de material adsorvente e uma mistura eluente de n-hexano:acetato de etila (7:3, v/v) proporcionaram os melhores resultados em termos de recuperação para os cinco pesticidas avaliados, sendo que os valores obtidos ficaram entre 85,4 e 114,1%, com RSD menor que 15%. Os valores de LOQ nas amostras foram de 14 a 20 ng L<sup>-1</sup>.

Após a etapa de validação, o procedimento de análise foi aplicado em simulações de sessões de diálise realizadas em laboratório, para verificar se ocorre a passagem dos referidos pesticidas através das membranas utilizadas no processo. Foram avaliados dialisadores disponíveis comercialmente com membranas de acetato de celulose e de polissulfona. Para tal, empregou-se amostras de água destilada/desionizada, fortificadas com os cinco pesticidas organoclorados. Verificou-se que tais membranas são permeáveis aos pesticidas em questão. Embora a passagem dos pesticidas através das membranas tenha ocorrido em níveis baixos (ng L<sup>-1</sup>), tal situação não deve ser desconsiderada, uma vez que os pacientes submetidos a este tipo de tratamento são expostos a grandes volumes de água a cada sessão, que são repetidas com frequência por longos períodos. É importante destacar, também, que os pesticidas organoclorados são caracterizados por apresentar efeitos cumulativos.

**ABSTRACT**

MASTER DISSERTATION

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSMVALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE USING SPE AND  
GC-ECD FOR THE DETERMINATION OF ORGANOCHLORIDE  
PESTICIDES IN WATER AND EVALUATION OF THE PERMEABILITY  
OF THOSE IN THE DIALYSERS USED IN HAEMODIALYSIS

The dialysis of the blood, within which the most applied modality is the haemodialysis, is a method thoroughly used for the treatment of the renal inadequacy. With this treatment, toxic substances accumulated in the patient's body that have not been eliminated by the urine, are removed. The process happens as an "artificial kidney" (dialyser) that is constituted of that is constituted of a group of fine capillary with semi permeable walls. The blood goes through the inside of these capillary ones and through the outside, in opposite direction, the dialysis solution (a saline solution diluted in water) passes by.

The volume of water used in each haemodialysis session is about 120 L per patient. If the water used is not monitored, pollutants can have cumulative effects in the patient, as the organochloride pesticides.

With this work, it was developed and validated an analytical procedure for the determination of low concentrations of five organochloride pesticides ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, DDE, DDT and endrin) in water, using Solid Phase Extraction for the pre-concentration and Gas Chromatography with Electron

Capture Detection for the determination of the pesticides. Tests were accomplished to optimize the pre-concentration method in which cartridges of C18-E having 500 mg of adsorbent material and an eluent mixture of n-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v) produced the best results in terms of recovery for the five analyzed pesticides, and the obtained values were between 85.4 and 114.1%, with smaller RSD than 15%. The values of LOQ in the samples were from 14 to 20 ng L<sup>-1</sup>.

After the validation stage, the analysis procedure was applied in simulations of dialysis sessions accomplished in laboratory, to verify whether it happens the passage of the referred pesticides through the membranes used in the process. Dialysers with membranes of cellulose acetate and of polysulfone, which are commercially available, were evaluated. For such, samples of water distilled/deionized, fortified with the five organochloride pesticides were used. It was verified that such membranes are permeable to the referred pesticides. Although the passage of the pesticides through the membranes has happened in low levels (ng L<sup>-1</sup>), such situation should not be disregarded, since the patients submitted to this kind of treatment are also exposed to great volumes of water in each session, that are frequently repeated for long periods of time. It is also important to highlight that the organochloride pesticides are characterized for presenting cumulative effects.

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento dialítico que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal crônica é também responsável por sérias complicações. Até 1970, acreditava-se que a água potável também servisse para a hemodiálise. Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitiram correlacionar os contaminantes da água com efeitos adversos do procedimento [1].

Apesar da água de abastecimento público que chega ao hospital ou unidade de saúde ser potável para consumo humano, ela é inadequada para uso em hemodiálise. A água potável geralmente contém cloro, ou dependendo de sua origem, pode conter também material orgânico, sais minerais, metais pesados, microorganismos, endotoxinas ou microcistinas produzidas por algas, devendo passar por tratamentos adicionais quando for usada para fins especiais. Os métodos de tratamento da água caracterizada para uso em hemodiálise são a osmose reversa e a deionização [2]. Osmose reversa é o processo pelo qual a água pura pode ser retirada de uma solução salina por meio de uma membrana semipermeável. A deionização consiste em eliminar praticamente todos os sais minerais através de resinas trocadoras de íons [1].

Nas sessões de hemodiálise a água tratada é usada para diluir soluções concentradas contendo sódio, cálcio, potássio, magnésio, acetato e glicose. Essas soluções concentradas de sais, depois de diluídas pelo equipamento de diálise, compõem a solução dialítica ou dialisato, também conhecida como fluido de diálise.

O dialisato é usado na filtração sanguínea de produtos metabólicos produzidos pelo paciente renal crônico. O equipamento de diálise mimetiza a função renal bombeando o sangue do paciente através de membranas semipermeáveis – os capilares ou dialisadores – imersos no dialisato, ocorrendo a filtração dos produtos indesejáveis contidos no sangue tais como uréia, creatinina,

ácidos orgânicos e medicamentos, que são substituídos por íons presentes no dialisato.

O volume de água usado em cada sessão de hemodiálise é cerca de 120 litros por paciente, que necessitará, em média, 3 a 4 sessões semanais, cada uma com duração de 4 horas. Se essa água não for monitorada em termos de controle de qualidade, qualquer contaminante químico ou biológico poderá ter efeitos cumulativos no paciente em processo dialítico [2].

Sob este ponto de vista, tornou-se obrigatório o monitoramento dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos da água para este uso especial. A Portaria nº 2.042, de 1996, expedida pelo Ministério da Saúde [3] normatizou o controle de qualidade da água na hemodiálise semestralmente. A Portaria nº 82, de 2000 [4], substituiu a Portaria 2.042, recomendando que “a água de abastecimento dos serviços de diálise proveniente da rede pública, de poços artesianos ou de outros mananciais deve ter o padrão de potabilidade em conformidade com o disposto na Portaria nº 36, de 1990” [5]. Os parâmetros definidos na Portaria nº 36 para contaminantes químicos como hidrocarbonetos halogenados voláteis e pesticidas que podem ficar como resíduos na água de abastecimento público, apesar de estarem dentro dos limites permitidos pela legislação vigente, podem ter efeito cumulativo nos pacientes em hemodiálise devido ao grande volume de água utilizado [2] e às suas características físico-químicas.

Em 2001, o Brasil reviu seus padrões de potabilidade para água, atualizados pela Portaria nº 1.469 [6], com critérios baseados em recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Com esta nova legislação, o número de substâncias químicas que representam risco à saúde aumentou visando a melhoria da qualidade da água para consumo humano. Recentemente, foi publicada nova legislação, a Portaria nº 518, de 2004 [7] que veio a substituir a Portaria nº 1.469.

Em vista do exposto, fica claro que a saúde dos pacientes com insuficiência renal depende diretamente da qualidade da água que é utilizada no tratamento dialítico, por isso é de fundamental importância o desenvolvimento de

procedimentos analíticos capazes de determinar a presença de contaminantes na água, em concentrações extremamente baixas.

Entre os vários poluentes orgânicos das águas, os pesticidas são muito perigosos e danosos devido a seus efeitos cumulativos, tóxicos e carcinogênicos [8]. Quando presentes na água potável, geralmente encontram-se em níveis muito baixos, que requerem o uso de procedimentos de pré-concentração para a realização de monitoramento destes níveis [9].

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um procedimento analítico para a determinação de cinco pesticidas organoclorados ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, DDE, DDT e endrin) em água, utilizando Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) para a pré-concentração das amostras, com determinação por Cromatografia Gasosa e aplicá-lo em simulações de sessões de diálise realizadas em laboratório para verificar se ocorre a passagem dos referidos pesticidas através das membranas utilizadas no processo de hemodiálise.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fisiologia renal**

Os rins são órgãos duplos situados na porção alta e posterior do abdômen. Têm o formato de grão de feijão e medem cerca de 12 x 6 cm, pesando aproximadamente 150 g cada um [10]. A unidade básica formadora de urina nos rins é o néfron, que consiste em um dispositivo de filtração, o glomérulo, conectado a uma porção tubular que reabsorve e condiciona o filtrado glomerular. Cada rim humano é composto por cerca de um milhão de néfrons [11].

As atividades dos rins são complexas, sendo que passam por eles, diariamente, cerca de 2.000 L de sangue, dos quais aproximadamente 180 L são filtrados, produzindo em torno de 1,2 L de urina. Desta forma, estes órgãos purificam o sangue. São eles que filtram, limpam e participam do controle de líquidos e do equilíbrio de eletrólitos do organismo.

No entanto, quando os rins deixam de cumprir suas funções, as impurezas e substâncias tóxicas começam a se acumular no sangue, dando origem a uma falência geral do organismo podendo levar o indivíduo à morte caso não receba auxílio médico. Após o diagnóstico da insuficiência renal, o tratamento pode envolver um processo substituto para as funções renais: a diálise ou o transplante renal [10]. Diálise é um processo de difusão usado na separação de solutos de um solvente. Dentre as modalidades de diálise temos a diálise peritoneal e a hemodiálise [12], sendo a última o enfoque deste trabalho.

### **2.2 Diálise peritoneal**

A diálise peritoneal utiliza uma membrana semipermeável que existe dentro do corpo, como um filtro natural. Este filtro é o peritônio, uma membrana que reveste o abdômen. Ela envolve e reveste os órgãos internos do corpo, sendo

ricamente vascularizada. A solução de diálise é infundida na cavidade peritoneal por meio de um cateter inserido permanentemente por procedimento cirúrgico. Parte do cateter permanece fora do abdômen, sendo o meio de conexão com as bolsas contendo a solução de diálise. A solução de diálise é infundida na cavidade peritoneal por gravidade. Uma vez que a solução está dentro da cavidade peritoneal, a diálise acontece: o excesso de água e as substâncias tóxicas saem do sangue e vão para a solução de diálise. Após algumas horas a solução de diálise precisa ser trocada. Este tipo de tratamento, por ser realizado de modo natural e contínuo, é considerado um tratamento lento, pois ocorre durante as 24 horas do dia [13].

### **2.3 Hemodiálise**

A hemodiálise é um tratamento que remove as substâncias tóxicas e o excesso de líquido acumulado no sangue e tecidos do corpo em consequência da falência renal. Neste processo grandes quantidades dessas substâncias podem ser removidas de maneira rápida e eficiente quando comparada à diálise peritoneal.

O sangue é removido do corpo para um sistema extracorpóreo (máquina de diálise) através de uma bomba que o impulsiona para dentro de um filtro (dialisador), também conhecido como rim artificial.

Por ser uma terapia intermitente, o processo de filtração sanguínea extracorpóreo dura cerca de 4 horas, exigindo que o paciente se desloque para o hospital ou unidade de tratamento em média três vezes por semana. No intervalo entre as sessões o paciente pode exercer suas funções normais de trabalho, porém as toxinas vão se acumulando no corpo, sendo necessária uma restrição alimentar e maior controle na ingestão de água e sal [14].

O sangue sai do organismo através de uma agulha inserida na veia, é impulsionado por uma bomba a uma vazão de  $300 \text{ mL min}^{-1}$ , percorre um circuito extracorpóreo e entra no dialisador instalado na máquina de hemodiálise. Em sentido oposto flui a solução dialítica a uma vazão de  $500 \text{ mL min}^{-1}$ , que recebe



as impurezas e a água do sangue, sendo estes então desprezados. O sangue purificado retorna ao paciente [15].

A Figura 1 mostra um esquema do processo de hemodiálise e a Figura 2 uma máquina de hemodiálise.

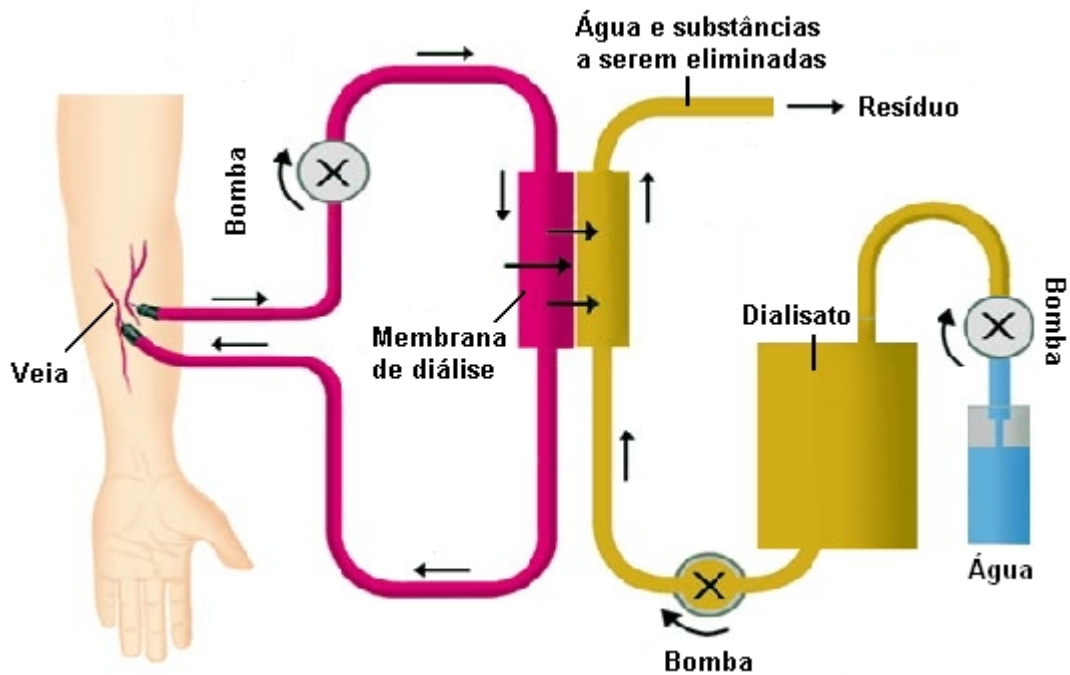


Figura 1. Esquema do processo de hemodiálise [10, modificada].



Figura 2. Máquina de hemodiálise [10].

### 2.3.1 Dialisador ou membrana de diálise

A membrana artificial de diálise é formada por finos tubos (capilares) semipermeáveis, de diâmetro interno entre 200 e 250  $\mu\text{m}$ , cujas paredes possuem espessura entre 6,5 e 40  $\mu\text{m}$ , com numerosos poros microscópicos, revestidos por material plástico, denominada de dialisador capilar, que possui tamanho e volumes variáveis de acordo com a prescrição médica [15]. As membranas em uso clínico são manufaturadas de polímeros sintéticos ou celulose [16], sendo que as baseadas em celulose cobrem cerca de 80% dos tratamentos [17]. A Figura 3 mostra detalhes de dialisadores para uso em hemodiálise.



(a)



(b)



(c)

**Figura 3.** Detalhes dos dialisadores utilizados em hemodiálise: **(a)** dialisador [18]; **(b)** dialisador aberto mostrando os capilares que o constituem [19]; **(c)** foto ampliada dos capilares [20].

Recentemente, em 2004, foi publicada pelo Ministério da Saúde, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 154 [21], que permite a reutilização

dos dialisadores pelo mesmo paciente por até 12 vezes, desde que sejam devidamente desinfetados após cada sessão.

Para correta desinfecção, os dialisadores devem ser mantidos preenchidos com solução de formaldeído 4% (v/v) ou outros produtos registrados no Ministério da Saúde para esta finalidade [3].

### **2.3.2 Problemas relacionados à água utilizada em hemodiálise**

Um dos primeiros eventos mórbidos relacionados à qualidade da água utilizada em hemodiálise foi a chamada “síndrome da água dura”, que se caracterizava pelo aparecimento de náuseas, vômitos, letargia, fraqueza muscular e hipertensão arterial. Tal quadro estava diretamente relacionado à presença de cálcio e magnésio na água não tratada corretamente.

Em 1980, na cidade de Maryland (EUA), ocorreu um acidente por excesso de flúor na água (fluoretação para prevenção de cárie) que provocou complicações graves em 8 pacientes e óbito de um deles. Oito anos depois, na Filadélfia (EUA), foram descritos 44 casos de hemólise devido à remoção inadequada de cloro da água destinada à diálise [1].

No início de 1996, 123 pacientes de Caruaru (Pernambuco, Brasil) apresentaram um quadro clínico de grave hepatotoxicidade, que não era correlacionada com nenhum dos fatores usualmente tidos como causadores deste tipo de intoxicação. Destes, 54 vieram a falecer até cinco meses após início dos sintomas. As intoxicações foram causadas por hepatotoxinas originadas dos mananciais de água de abastecimento da região que tiveram ocorrência da floração de cianobactérias, contaminando também a água tratada para hemodiálise [2].

Além dos casos relatados, inúmeros outros já ocorreram, o que demonstra que a água usada em hemodiálise deve ser constantemente monitorada.

Segundo Loganathan e Kannan [22], os problemas ambientais relacionados com o uso de pesticidas organoclorados sintéticos têm sido motivo de preocupação. Isso inclui o impacto ambiental em organismos não-alvos, bioacumulação, biomagnificação e persistência no meio ambiente. Estes

pesticidas, quando usados na agricultura, podem ser lixiviados pela chuva, sendo transportados através das camadas do solo, podendo poluir águas subterrâneas [23]. Embora estes fatos sejam já bem estabelecidos, é difícil comprovar a relação entre a presença destes contaminantes orgânicos e complicações apresentadas por pacientes submetidos à hemodiálise. Mas isso não significa que não haja uma preocupação com a possibilidade da presença destes pesticidas na água de abastecimento das unidades de diálise.

## 2.4 Pesticidas

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada à aplicação de substâncias químicas para controlar pestes, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas [24].

No Brasil, em 2001, segundo Santos *et al.* [25], o Ministério da Saúde definiu pesticidas como “substância (ou mistura de substâncias) destinada a prevenir a ação ou destruir direta ou indiretamente insetos, ácaros, fungos, roedores, nematóides, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura, à pecuária, a seus produtos e outras matérias-primas. Nesta definição incluem-se ainda os desfolhantes, desseccantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal; excluem-se as vacinas, medicamentos, antibióticos de uso veterinário e agentes de controle biológico”.

Atualmente, no Brasil, mais de 300 princípios ativos e mais de 4.000 produtos comerciais e formulações de pesticidas estão no mercado e seu uso continua em crescimento, em função do aumento da área cultivada, apesar do aumento da produção agrícola ecologicamente correta [25].

Dentre os pesticidas sintéticos destinados ao controle de insetos, denominados inseticidas, encontram-se os organoclorados, que são o alvo deste estudo. Embora tendo uso proibido no Brasil desde 1985, sendo esta proibição válida nos dias de hoje, os organoclorados continuam sendo permitidos em campanhas de saúde pública no combate à malária e leishmaniose, bem como em uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da Agricultura. Também foi mantida a permissão para o uso de cupinidas e iscas formicidas [26].

### 2.4.1 Contaminação por resíduos de pesticidas

Os pesticidas aplicados em lavouras, terrenos ou processos de reflorestamento podem ligar-se aos sedimentos do solo, sofrer ação de lixiviação e contaminar águas, por volatilização contaminar o ar ou serem absorvidos por microorganismos, vegetais ou animais.

A contaminação pode alcançar águas subterrâneas e águas tratadas para consumo humano. Em geral, os lençóis freáticos apresentam riscos moderados de contaminação, porém as cargas contaminantes variam dependendo de condições locais (temperatura, acidez, alcalinidade...) [26].

As principais fontes de resíduos de pesticidas em águas, alimentos e solo são [27]:

- a. aplicação de pesticidas em solo ou lavouras;
- b. lixiviação de pesticidas para águas subterrâneas;
- c. derivação de pesticidas de campos adjacentes;
- d. transporte em solos com a aplicação em lavouras;
- e. despejo em rios e lagos;
- f. efluentes industriais;

### 2.4.2 Persistência e efeitos cumulativos dos pesticidas organoclorados

Os pesticidas mais nocivos que ficaram conhecidos como os “doze sujos” (ou “dúzia suja”, do inglês *dirty dozen*) são [28]:

1. DDT e isômeros;
2. os “drins”: aldrin, dieldrin e endrin;
3. clordano e lindano;
4. heptacloro;
5.  $\gamma$ -BHC;
6. paration;
7. monocrotofós;
8. aldicarb;
9. clordimeform;

- 10.2-4-5-T (utilizado no “Agente Laranja” em conjunto com o 2,4-D);
- 11. paraquat ;
- 12. fungicidas a base de mercúrio.

O diclorodifeniltricloroetano (DDT) foi o primeiro pesticida sintético organoclorado. Antes dele, os únicos pesticidas disponíveis eram a base de arsênio, muito tóxicos e persistentes, e aqueles extraídos de plantas, que perdiam rapidamente sua efetividade. O DDT parecia ser o pesticida ideal, pois não era muito tóxico para os seres humanos, mas era altamente tóxico para os insetos. O fato de ser persistente representava uma vantagem adicional.

No final da Segunda Guerra Mundial, em 1945, o DDT entrou em uso em todo o mundo como um inseticida doméstico para combater os vetores de doenças como a malária, e também, como pesticida agrícola, tendo a característica de matar os insetos mesmo após meses da aplicação. Com o passar dos tempos, os efeitos do DDT passaram a ficar menos intensos e o número de insetos mortos vinha diminuindo. Alguns estudos demonstraram que o DDT sofrera um efeito chamado resistência biológica, um processo de seleção natural através da sucessão de gerações de insetos expostas ao pesticida. Os insetos imunes ao DDT sobrevivem e geram novas gerações imunes ou resistentes, inviabilizando seu uso. Assim, foram surgindo outros pesticidas organoclorados sintéticos, sucessivamente o hexaclorociclohexano, clordano, aldrin, dentre outros, cada um desenvolvendo sua resistência similarmente ao DDT [29].

Em 1962, no livro “Primavera Silenciosa” (*Silent Spring*) [30], Rachel Carson lançou a primeira advertência sobre os perigos dos organoclorados. O alerta de Carson era claro: presentes em pesticidas, solventes, plásticos e outros produtos químicos, os organoclorados podem contaminar os organismos, assim como o ar, lagos, oceanos; já está suficientemente documentado o papel dos organoclorados afetando populações inteiras de aves, focas e outros animais, na infertilidade, na feminilização dos machos e no déficit de desenvolvimento dos órgãos sexuais.

Evidências científicas indicam que os organoclorados prejudicam o funcionamento interno do organismo humano ao alterar os níveis hormonais,

provocar defeitos congênitos e infertilidade, comprometer as funções mentais de crianças, causar e diminuir a resistência a enfermidades por deprimir o sistema imunológico [23].

Muitos pesticidas organoclorados encontram-se nos tecidos de peixes em concentrações maiores que as encontradas nas águas em que vivem. As substâncias hidrofóbicas, como o DDT, são particularmente propensas em exibir este fenômeno. Existem várias explicações para a bioacumulação de produtos químicos em sistemas biológicos. Por serem compostos lipofílicos e acumularem-se em tecidos gordurosos do organismo, as taxas de eliminação são mais lentas do que taxas de absorção e geram a bioacumulação, ou seja, níveis mais altos são encontrados no organismo do que em seu meio circundante. A concentração média destes pesticidas aumenta também de forma significativa à medida que se avança na cadeia alimentar, que consiste em uma seqüência de espécies nas quais cada uma alimenta-se de outra precedente na cadeia. Um produto químico cuja concentração aumenta ao longo de uma cadeia alimentar chama-se biomagnificado. Essencialmente, a biomagnificação resulta de uma seqüência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia [31].

Lesões hepáticas e renais, mutagênese, carcinogênese, desenvolvimento de tumores malignos em animais de laboratórios foram comprovados após absorção prolongada de organoclorados, especialmente o DDT,  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC, aldrin, dieldrin, clordano, heptacloro, toxafeno e dodecacloro [32].

Segundo Ware (1994) [33], os pesticidas, em sua maioria, são planejados para matar organismos selecionados, bloqueando algum processo metabólico.

Os organoclorados são absorvidos por via oral, respiratória e dérmica. Seu mecanismo de ação não é inteiramente conhecido, sabendo-se que atingem o sistema nervoso, tanto o periférico como o central. Sendo lipossolúveis, estes compostos e seus produtos de degradação depositam-se na gordura animal, sendo cumulativos, a cada exposição. Maior quantidade se acumula no tecido adiposo. São capazes de atravessar a placenta, sendo potencialmente teratogênicos [25].

Os sinais e sintomas mais evidentes no envenenamento agudo por pesticidas organoclorados incluem cefaléia, que não cede aos analgésicos

comuns, náuseas, vômitos, vertigens, hiperexcitabilidade, tremores e convulsões. As intoxicações crônicas são caracterizadas por perda de peso, cefaléia, tremores, especialmente nas extremidades superiores, debilidade muscular, ataxia e incoordenação, dificuldade na fala e no aprendizado, dor torácica e erupções na pele [34].

O DDT e seus derivados afetam os axônios dos neurônios de uma forma que impede a transmissão normal dos impulsos nervosos, tanto nos insetos quanto nos mamíferos. Eventualmente, o neurônio emite impulsos espontaneamente, fazendo com que os músculos contraiam-se, causando o “tremor do DDT”, o que geralmente é seguido por convulsões e morte. O DDT é um inseticida de ação relativamente lenta e tem a qualidade incomum de ser mais tóxico para os insetos à medida que a temperatura ao seu redor diminui [31].

### **2.4.3 Propriedades químicas dos pesticidas organoclorados**

O carbono forma muitos compostos com cloro, alguns dos quais são encontrados na natureza, embora normalmente em quantidades muito pequenas. Em virtude de sua toxicidade para algumas plantas e insetos, muitos compostos organoclorados, produzidos sinteticamente pela ação de cloro elementar sobre hidrocarbonetos, têm tido um amplo uso como pesticidas [31].

São compostos de estruturas normalmente cíclicas, com massa molecular de 290 a 545 g mol<sup>-1</sup>, com propriedades físicas e químicas semelhantes, bastante lipofílicos e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos [34].

A ligação entre carbono e cloro caracteriza-se por ter alta energia e ser difícil de romper. A presença do cloro reduz a reatividade de outras ligações das moléculas orgânicas. Essa propriedade significa que, uma vez que os organoclorados tenham entrado no meio ambiente, eles degradam-se muito lentamente, tendendo a acumular-se. Além disso, a maioria dos pesticidas organoclorados é hidrofóbica, ou seja, têm baixa solubilidade em água, mas têm alta solubilidade em óleos ou tecidos adiposos. A falta de uma via eficiente para a



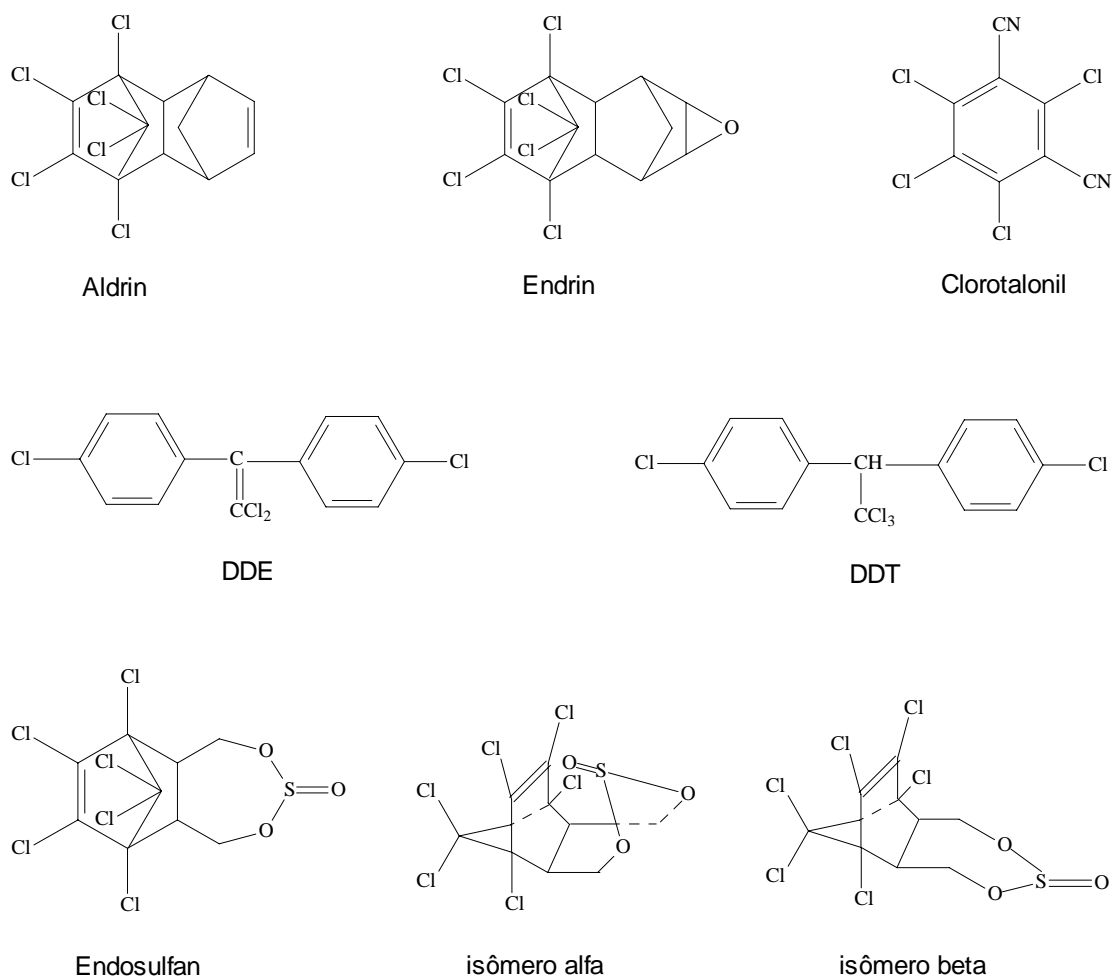
degradação, em combinação com sua hidrofobicidade, têm levado a seu acúmulo em organismos vivos, incluindo peixes, seres humanos e outros animais. A totalidade dos seres vivos sofre uma contaminação de baixo nível por esses produtos químicos. Muitos dos esforços dos órgãos governamentais e de grupos ambientalistas, em décadas passadas, foram no sentido de documentar essa contaminação e regulamentar o uso, impedindo que suas concentrações atinjam níveis perigosos, particularmente em nossa dieta alimentar [35].

Em comum, os organoclorados apresentam: estabilidade química, baixa pressão de vapor, baixa solubilidade em água e são relativamente inertes frente a ácidos e bases. Sofrem reações químicas sob luz solar formando compostos com estabilidade similar ou até maior que os compostos de origem [36] e apresentam enriquecimento na cadeia alimentar [31]. Devido a essas características, são compostos danosos ao meio ambiente e bioacumuláveis nos organismos vivos.

## 2.5 Pesticidas avaliados

Para este estudo, foram selecionados alguns dos pesticidas organoclorados que devem ser monitorados na água de abastecimento das unidades de diálise. Também fez parte deste trabalho um pesticida de outra classe química, o clorotalonil, que foi avaliado como padrão interno, o que será discutido posteriormente. Na Figura 4 estão representadas as fórmulas estruturais dos pesticidas que foram selecionados para este trabalho.

O aldrin (1,2,3,5,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-exo-5,8-dimetanonaftaleno), também conhecido pelos nomes comerciais Aldrex<sup>®</sup> ou Toxadrin<sup>®</sup>, é um inseticida organoclorado de massa molecular 364,9 g mol<sup>-1</sup>, cuja fórmula empírica é representada por C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>. Quando puro é um sólido cristalino com ponto de fusão de 104-104,5 °C. O produto de grau técnico é uma substância de cor pardacenta, sendo constituído de mais de 95% do composto puro e 5% de outros componentes. É praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos; estável em meio alcalino e meio ácido em pH superior a 3. É altamente persistente no meio ambiente [34].



**Figura 4.** Fórmulas estruturais dos pesticidas selecionados para este trabalho.

O clorotalonil é um fungicida de estrutura aromática substituída, derivado da ftalonitrila, também conhecido como Bravo<sup>®</sup> ou Bravonil<sup>®</sup>, cujo nome químico é 2,4,5,6-tetracloro-1,3-benzenodicarbonitrila. Sua fórmula empírica é  $C_8Cl_4N_2$  possuindo massa molecular de  $256,9 \text{ g mol}^{-1}$ . O produto sólido apresenta-se de coloração branca, inodoro ou com odor fracamente picante, com ponto de fusão de  $252,1^\circ\text{C}$ . É considerado insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Estável à temperatura ambiente, à luz ultravioleta em meio aquoso e no estado cristalino, em soluções ácidas e moderadamente alcalinas [34].

O DDT, abreviatura para diclorodifeniltricloroetano [31], um inseticida organoclorado, também conhecido como Anofex<sup>®</sup>, Cesarex<sup>®</sup> ou Neocid<sup>®</sup>, de nome químico 2,2-bis(*p*-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano, com fórmula empírica  $C_{14}H_9Cl_5$  e

massa molecular de  $354,5 \text{ g mol}^{-1}$ , quando puro é um sólido branco cristalino, com ponto de fusão de  $108 \text{ }^\circ\text{C}$ . O produto grau técnico é um sólido amorfo, de cor creme, sendo constituído de isômeros e impurezas de fabricação. O composto puro é praticamente insolúvel em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos (58 g em 100 mL de acetona; 106 g em 100 mL de benzeno). Classificado como altamente persistente no meio ambiente [34].

Já o DDE, abreviatura para diclorodifenildicloroetano [31], é o principal metabólito do DDT, de nome químico 2,2-bis(*p*-clorofenil)-1,1-dicloroetileno, cuja fórmula empírica é  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_4$ , possuindo massa molecular de  $318 \text{ g mol}^{-1}$ . O produto sólido é insolúvel em água e solúvel em xileno. É sensível à exposição à luz, sendo que soluções em água, etanol ou acetona permanecem estáveis por 24 h em condições normais de laboratório [34].

O inseticida organoclorado endosulfan (1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo-(2,2,1)-hepteno-2,5,6-bis(metileno)-sulfito) é uma mistura de dois estereoisômeros: o  $\alpha$ -endosulfan e o  $\beta$ -endosulfan. É também conhecido pelos nomes comerciais Tiodan<sup>®</sup>, Malix<sup>®</sup> e Ciclodan<sup>®</sup>. Possui massa molecular de  $406,9 \text{ g mol}^{-1}$  e fórmula empírica  $\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_3\text{S}$ . É um sólido cristalino de cor marrom, com odor de dióxido de enxofre. Funde entre  $70$  e  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . É estável à ação de ácidos e bastante instável à ação de álcalis. É insolúvel em água e moderadamente solúvel na maioria dos solventes orgânicos (33% em acetona; 37% em benzeno; 45% em xileno e 11% em metanol) [34].

O endrin (Endrex<sup>®</sup>, Hexadrin<sup>®</sup>), de massa molecular  $380,9 \text{ g mol}^{-1}$  é também um inseticida organoclorado, de nome químico 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octaidro-1,4-endo-endo-5,8dimetanonaftaleno, tendo a fórmula empírica  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$ . O composto puro é um sólido cristalino branco, que funde a mais de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , com decomposição. O produto de grau técnico é de cor pardacenta e apresenta cerca de 85% do composto ativo. É praticamente insolúvel na água e moderadamente solúvel em acetona, benzeno e xileno [34].

Na Tabela 1 encontram-se algumas das características físico-químicas dos compostos organoclorados estudados.

**Tabela 1.** Características físico-químicas dos pesticidas avaliados.

Pesticida	Nº CAS	PV (mPa) (20 °C)	Log $K_{OW}$	Densidade (20 °C) (g cm <sup>-3</sup> )
Aldrin	300-00-2	8,6	5,2	1,6
DDE	3547-04-04	2,09	5,7	
DDT	50-29-3	0,025	6,2	1,56
Endosulfan	115-29-7	0,83	$\alpha= 4,74; \beta= 4,79$	1,8
Endrin	72-20-8	$2 \times 10^{-5}$	5,6	1,64

O coeficiente de partição octanol-água ( $K_{OW}$ ), por uma questão de conveniência, é com freqüência reportado em sua forma logarítmica decimal dado que sua magnitude é muitas vezes grande. Por exemplo, se o  $K_{OW}$  de um pesticida é de cerca de 100000 ( $10^5$ ), seu  $\log K_{OW} = 5$ . Os produtos químicos com valores de  $\log K_{OW}$  na faixa de 4 a 7 são os que bioacumulam em maior grau [31].

Pressão de vapor (PV) é uma medida da capacidade de um composto em volatilizar-se a uma determinada temperatura.

De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 518, de 2004 [7] que estabelece os padrões de potabilidade da água para o consumo humano, os pesticidas organoclorados avaliados neste estudo têm um Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido. A Tabela 2 especifica estes limites.

**Tabela 2.** Limite máximo de resíduo permitido para os pesticidas avaliados, em água potável, segundo a legislação brasileira [7].

Pesticida	LMR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
-----------	------------------------------

$\Sigma$ DDT (DDD*, DDE, DDT)	2,0
Endosulfan**	20
Endrin	0,6

\* não avaliado neste trabalho  
 \*\* avaliadas as formas  $\alpha$  e  $\beta$

## 2.6 Determinação de pesticidas organoclorados em águas utilizando SPE

Pesticidas organoclorados são usualmente determinados por técnicas cromatográficas, em especial a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), utilizando Detecção por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron-Capture Detection*) ou detecção por Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

A necessidade de extrair grandes volumes de água para determinar pequenas quantidades de analitos requer o uso de procedimentos de pré-concentração adequados. As escolhas mais comuns são pela SPE ou pela Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) seguida da concentração dos extratos por evaporação do solvente e dissolução do resíduo em pequeno volume de solvente orgânico, o que, no entanto, pode gerar perdas dos analitos.

A SPE é utilizada rotineiramente para extrair resíduos de pesticidas presentes em amostras de água devido à grande variedade de materiais adsorventes disponíveis, simplicidade, reduzido consumo de solventes e pelos altos fatores de pré-concentração alcançados. Este método de extração envolve a sorção dos analitos, presentes em um volume relativamente grande de água, em um adsorvente adequado e sua dessorção por um solvente de eluição [37]. As etapas envolvidas na SPE serão discutidas no item 3.8.

O formato mais popular em SPE é o de cartucho, usualmente polipropileno, dentro do qual o material de empacotamento fica retido entre dois discos de

polietileno. A parte inferior do cartucho é afunilada e apresenta uma extensão que se encaixa em um dispositivo para efetuar vácuo. Uma alternativa ao uso de cartuchos em SPE foi o desenvolvimento de discos semelhantes a membranas empregadas em filtração. Geralmente, esses discos são constituídos de matrizes de teflon flexível, embebidos ou impregnados com a fase estacionária. A vantagem desses sistemas é a ausência de canais formados pelo material de empacotamento, o que ocorre com frequência quando se empregam cartuchos. A existência de canais em leitos empacotados provoca a formação de fluxos não uniformes, reduzindo a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados analíticos [38].

Dos materiais adsorventes disponíveis, a sílica quimicamente ligada é a mais amplamente empregada quando se trabalha com pesticidas organoclorados. Os grupos quimicamente ligados que interagem com os compostos podem apresentar polaridades variáveis tais como hidrocarbonetos lineares C8 e C18, grupos ciano ou amino, etc. Também são utilizados como adsorventes alguns tipos de resinas poliméricas, entretanto, a sílica quimicamente ligada apresenta vantagens sobre tais resinas: não requer passos extensivos de *clean up*, apresentam menores interferências durante a análise cromatográfica e o consumo de solventes é menor. Por outro lado, resinas poliméricas são mais baratas e permitem a extração de maiores volumes de água, mais rapidamente [9].

Em 1976, Visi *et al.* [39] iniciaram na Hungria um programa de monitoramento para determinar a presença de resíduos de pesticidas em águas de superfície. No início do programa, a extração empregada era a LLE, sendo posteriormente substituída pela SPE, que forneceu vantagens quanto ao tempo de análise e custo, embora as recuperações tenham sido consideradas satisfatórias (entre 70 e 110%) em ambos os casos.

Beltran, López e Hernández [40] realizaram um estudo comparativo da extração de 4 pesticidas organoclorados e 3 organofosforados utilizando discos e cartuchos de C18. Obtiveram recuperações de 73 a 101% e 51 a 112% para cartuchos e discos, respectivamente. Concluíram que além de proporcionar melhores recuperações, os cartuchos ainda apresentavam a vantagem de redução do tempo de evaporação do solvente após eluição e, conseqüentemente,

do tempo total de análise, uma vez que a eluição havia sido realizada com 4 mL de acetato de etila, enquanto foram necessários 15 mL do mesmo solvente para os discos. Neste trabalho foram alcançados limites de detecção em torno de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Um procedimento envolvendo SPE em discos de C18 foi realizado por Tríska [41] para determinação de 18 pesticidas, por GC-MS, em amostras de água destilada fortificadas. Neste estudo, 10 L de amostra foram pré-concentrados e após eluídos com 40 mL de uma mistura 1:1 (v/v) de diclorometano e acetona, concentrados em evaporador rotatório. Recuperações de 88,8 e 92,9% foram obtidas para os compostos  $\alpha$  e  $\beta$  endosulfan, respectivamente.

Patsias e Papadopoulou-Mourkidou [42] determinaram, através de um método multirresíduos, 96 pesticidas em amostras de águas de profundidade utilizando cartuchos C18 para pré-concentração das amostras e eluição com acetato de etila. A determinação foi realizada por GC-MS sendo alcançados limites de detecção em torno de  $10 \text{ ng L}^{-1}$ . Entre os compostos avaliados encontram-se os que são objeto deste estudo.

Outro estudo comparativo entre SPE em discos e cartuchos foi realizado por Viana *et al.* [43]. Organoclorados, organofosforados, carbamatos e triazinas, num total de 40 pesticidas foram determinados em amostras de água destilada fortificadas no nível  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para a maioria dos compostos avaliados os cartuchos forneceram melhores percentuais de recuperação. A mistura de solventes para a eluição foi n-hexano e acetato de etila (1:1, v/v).

Resíduos de pesticidas em amostras de solos e águas de rios foram monitorados no ano de 2000, no Egito, por El-Kabbany, Rashed e Zayed [44], sendo detectada a presença de 16 organoclorados nas amostras de água. Estas foram pré-concentradas em cartuchos C18 e a eluição realizada com uma mistura de acetato de etila e metanol (1:1, v/v). As amostras de solo foram submetidas a LLE e ao *clean up* por Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*). Os resultados confirmaram a presença de resíduos de pesticidas de diferentes classes químicas, sendo que as maiores concentrações de organoclorados foram encontradas nas amostras de água e de organofosforados nas amostras de solo.

Coupe *et al.* [45] realizaram um estudo, utilizando SPE, para determinar a ocorrência e a distribuição de 49 pesticidas no ar e em águas de chuva de áreas urbanas e rurais, no estado do Mississippi, EUA. Mesmo após décadas desde que o DDT e seus análogos foram banidos do país, o DDE foi encontrado em todas as amostras de ar de regiões agrícolas e em mais da metade das amostras de água das zonas urbanas.

Valcárcel *et al.* [37] desenvolveram um procedimento para a determinação de 13 pesticidas organoclorados em amostras de água, dentre eles,  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan, utilizando SPE e GC-ECD. Os analitos presentes em 10 mL de amostras fortificadas ao nível  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  foram pré-concentrados em cartuchos C18 contendo 70 mg de material adsorvente e eluídos com 80  $\mu\text{L}$  de acetato de etila. A recuperação média foi de 92%. Os limites de detecção alcançados pelo procedimento proposto ficaram entre 0,01 e  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Com o objetivo de determinar a contaminação de águas de profundidade, vários pesticidas foram estudados em Portugal, por Batista *et al.* [46], dentre os quais  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan. As amostras foram submetidas à extração por SPE em discos, eluídas com uma mistura de acetato de etila e diclorometano (1:1, v/v), com determinação por GC-MS. As recuperações variaram entre 81 e 100%, sendo alcançados limites de detecção em torno de  $25 \text{ ng L}^{-1}$ .

Huasheng *et al.* [47] encontraram os pesticidas organoclorados hexaclorociclohexano ( $62,5 \text{ ng L}^{-1}$ ) e DDT ( $48,7 \text{ ng L}^{-1}$ ) em águas fluviais através da aplicação de um procedimento desenvolvido para a determinação de 17 organoclorados e 18 organofosforados usando SPE.

Diferentes métodos de extração foram avaliados por Simal-Gándara *et al.* [48] para a determinação de  $\alpha$  e  $\beta$ -endossulfan em amostras de água. Os melhores resultados em termos de recuperação foram obtidos quando a extração foi realizada por SPE.

A ocorrência de pesticidas organoclorados em águas de superfície foi estudada, na Grécia, durante um período de 2 anos, por Goufinopoulos *et al.* [49]. A extração dos analitos foi realizada em cartuchos C18 (500 mg), sendo a eluição com 10 mL de hexano, seguida da evaporação sob fluxo de nitrogênio. Em algumas amostras avaliadas as concentrações detectadas foram mais altas que



os níveis estabelecidos pela União Européia, especialmente para os pesticidas aldrin e hexaclorociclohexano.

Um procedimento de SPE *on line*, empregando GC-MS para a determinação de organoclorados em águas foi desenvolvido por Marcé *et al.* [50]. A pré-concentração foi realizada em uma pré-coluna de material polimérico, sendo a eluição com acetato de etila. Os limites de detecção alcançados ficaram entre 0,001 e 0,036  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O pesticida DDE foi encontrado nas amostras analisadas em concentrações médias de 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Poluentes orgânicos em águas fluviais foram monitorados durante um período de 3 anos, por Namiésnik *et al.* [51]. Foi analisada a ocorrência de pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) e bifenilas policloradas (PCBs, do inglês *Polychlorinated Biphenyls*). Para os pesticidas organoclorados a extração foi realizada em cartuchos C18, sendo a determinação por GC-ECD.

Sapota [52] investigou a ocorrência de pesticidas organoclorados e PCBs em água do mar, utilizando SPE, sendo a resina XAD-2 empregada como adsorvente. A concentração encontrada de DDT e seus isômeros ficou entre 0,05 e 0,32  $\text{ng L}^{-1}$ .

Na China, Yu *et al.* [53] avaliaram a presença de 16 PAHs, 12 PCBs e 18 pesticidas organoclorados em amostras de água de rio, utilizando SPE. As concentrações totais de organoclorados variaram entre 137,9 e 3788  $\text{ng L}^{-1}$ .

DDT e seus isômeros, clordano, hexaclorobenzeno, heptacloro e endosulfan foram determinados em águas potável, superficiais e marinhas, na África do Sul, por Fatoki e Awofolu [54]. As percentagens de recuperação empregando SPE para extração ficaram entre 71 e 101%. Os níveis encontrados nas amostras variaram entre 5,5 e 160  $\text{ng L}^{-1}$ , para DDT e hexaclorobenzeno, respectivamente.

## 2.7 Parâmetros cromatográficos

A seguir estão descritos os parâmetros cromatográficos empregados para avaliar a separação de analitos.

### 2.7.1 Fator de retenção (k)

É determinado pela razão entre o tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e o tempo que percorrem a coluna na fase móvel, de acordo com a equação (1):

$$k = \left( \frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

Onde:

$t_R$  = tempo de retenção de um analito, que é o tempo transcorrido desde a injeção até tempo equivalente ao ponto máximo do pico;

$t_M$  = tempo de retenção de um analito não retido;

$t'_R$  = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceites valores entre 0,5 e 20 [55,56].

### 2.7.2 Resolução (Rs)

A resolução refere-se à separação de dois picos adjacentes e pode ser obtida pela equação (2):

$$R_S = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) = 1,177 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right) \quad (2)$$

Onde:

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

$W_{b1}$  e  $W_{b2}$  = largura dos picos adjacentes na base, em unidades de tempo;

$W_{h1}$  e  $W_{h2}$  = largura dos picos adjacentes a meia-altura, em unidades de tempo.

Considera-se que:  $R_s = 1$  tem-se 98% de separação;  $R_s = 1,25$  tem-se 99,5% de separação e  $R_s = 1,5$  tem-se 100% de separação para picos gaussianos [55,56].

### 2.7.3 Fator de separação ( $\alpha$ )

O fator de separação está relacionado com a separação de dois picos adjacentes, sendo calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a equação (3):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

Como o fator de retenção ( $k$ ) mede a seletividade de um sistema cromatográfico, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação.

Se  $\alpha = 1$ , não existem diferenças termodinâmicas entre os dois componentes de um dado sistema e eles não podem ser separados. Contudo, quando  $\alpha > 1$  não significa que os dois picos estão totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem sobrepostos. Em consequência disto, um valor elevado de  $\alpha$  só implica em boa separação se os picos forem estreitos [55,56].

### 2.7.4 Curva de van Deemter

A curva de van Deemter é indicada, na caracterização cromatográfica de uma coluna, para determinar a vazão que se deve trabalhar a fim de obter a máxima eficiência ( $N$ ) da coluna. Uma interpretação desta curva é que existe uma vazão ótima, que está relacionada com a velocidade linear ótima ( $\mu$ ), na qual a

altura equivalente a um prato (H) terá um valor mínimo e, portanto o valor de eficiência será máximo. As equações para cálculo de N, H e  $\mu$  são apresentadas a seguir (equações 4, 5 e 6, respectivamente), onde L representa o comprimento da coluna cromatográfica [56]:

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

## 2.8 Validação de procedimentos analíticos

Uma vez desenvolvido um procedimento de análise cromatográfica, como em qualquer outra técnica analítica, torna-se importante fazer a validação do procedimento para avaliar se ele fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente [57].

Para a determinação de resíduos de pesticidas devem ser desenvolvidos métodos de extração eficientes, bem como procedimentos analíticos com alta seletividade, a fim de assegurar que caso estes resíduos estejam presentes nas amostras analisadas, seja possível a sua separação e posterior quantificação [58].

A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com a precisão e exatidão, consideradas na prática, como satisfatórias. A variabilidade associada a um procedimento analítico, deve levar em consideração todas as incertezas do processo, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, soluções de referência, calibrações, analista e ambiente [59].

A validação de um procedimento que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do procedimento. Desta forma, todas as variáveis devem ser consideradas, tais como: estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e avaliação dos dados [60].

Os parâmetros geralmente envolvidos na validação de procedimentos analíticos são: curva analítica, linearidade, seletividade, recuperação, precisão, limites de detecção e de quantificação e robustez [61,62].

### **2.8.1 Curva analítica e linearidade**

A calibração é um dos estágios fundamentais em análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo [57].

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector ( $y$ ) e a concentração ( $x$ ) do analito em estudo, podendo ser descrita pela equação da regressão linear:  $y = ax + b$ , onde  $b$  é a intersecção com o eixo  $y$  (coeficiente linear), quando  $x = 0$ , e  $a$  é a inclinação da curva (coeficiente angular) [63].

Linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível se relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração) [61].

A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas de diferentes concentrações, variando-se estas de acordo com a finalidade da análise [64].

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida pela equação 7:

$$(S/Q)_i \% = \left( \frac{S_i - b}{Q_i} \right) \times 100/a \quad (7)$$

Onde: b = coeficiente linear; a = coeficiente angular.

Os valores de S e Q são obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área ou altura do pico e concentração do analito.

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com  $r^2 = 1$ , e dentro da faixa linear, pode-se provar que  $(S/Q)_i = a$  para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ( $r^2 < 1$ ), que é o que ocorre na prática, e dentro da faixa linear,  $(S/Q)_i \approx a$ . Se  $(S/Q)_i \ll a$  ou  $(S/Q)_i \gg a$ , então o resultado pode ser assumido como fora da faixa linear. Conforme normas da União Internacional de Química Pura e Aplicada, (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), são considerados dentro da faixa linear, os pontos cujas razões sinal/concentração não ultrapassam mais de 5% do coeficiente angular da reta [65].

### 2.8.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

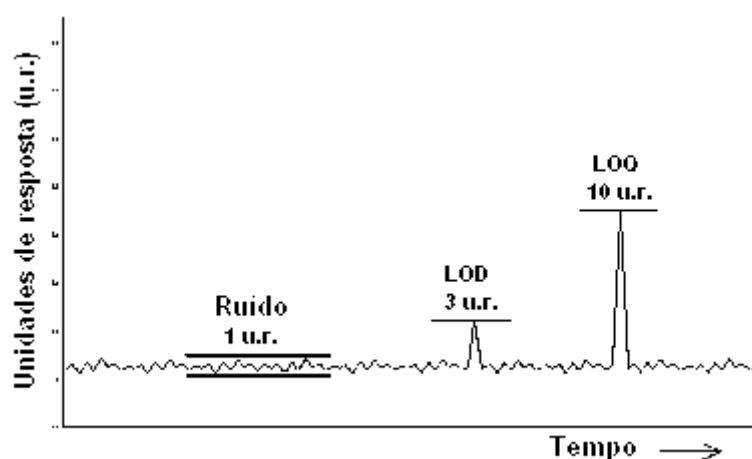
A sensibilidade de um procedimento analítico como um todo é, normalmente, definida em termos de Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) [61].

O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sendo geralmente expresso em unidades de concentração.

O LOQ é a menor concentração de soluto que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e também é geralmente expresso em unidades de concentração.

Estes limites podem ser obtidos de diferentes formas. Uma delas é através do método da relação sinal-ruído. Para determinar a relação sinal-ruído é feita a comparação entre a medida dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções aceitáveis como estimativas do LOD. Os mesmos critérios podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1 [66].

Neste trabalho convencionou-se denominar como unidades de resposta (u.r.) as medidas realizadas para determinar os valores de LOD, LOQ e ruído da linha base, conforme esquema demonstrado pela Figura 5.



**Figura 5.** Diagrama demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ.

Fonte: MISTURA, 2003 [64], modificada de CLIFTON, 1996 [67].

O ruído é a flutuação da linha base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada a nenhum composto detectado. Com o tempo, muda o ruído e conseqüentemente o LOD e o LOQ. É por isso que os instrumentos devem ser averiguados rotineiramente e os dados reportados de acordo com a variação em cada aquisição [67].

### 2.8.3 Recuperação

A recuperação (R) avalia a eficiência do método de extração do analito em amostras fortificadas da matriz e é geralmente expressa em termos de percentagem. É dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra e utilizando-se níveis próximos a esta faixa para fortificação [58]. A recuperação é calculada através da equação (8):

$$R (\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100 \quad (8)$$

#### 2.8.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), calculado pela equação (9) [66]:

$$RSD = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (9)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2 / n - 1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;

$x_m$  = média de uma série de medidas (replicatas);

n = número de medidas.

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária:



Repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo [66].

Precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Esta medida da precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados depois que esteja finalizado [66].

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para a execução deste trabalho, inicialmente realizou-se a seleção de alguns pesticidas presentes na Portaria nº 518/2004. Após, desenvolveu-se um procedimento de separação cromatográfica com otimização das condições, considerando-se melhor resolução, maior sensibilidade e menor tempo de análise. O passo seguinte foi a otimização do método de extração e pré-concentração dos analitos em água, utilizando SPE. Posteriormente, procedeu-se a validação do procedimento para análise dos pesticidas selecionados. Finalmente, foram realizadas simulações de sessões de diálise em escala laboratorial e aplicação do procedimento proposto para avaliar a difusão dos pesticidas através das membranas utilizadas no processo de hemodiálise.

#### **3.1 Reagentes e solventes**

- Padrões de referência dos pesticidas:  $\alpha$ -endosulfan e  $\beta$ -endosulfan (Dr. Ehrenstorfer<sup>®</sup>, Alemanha); aldrin, endrin, DDE e DDT (AccuStandard Inc<sup>®</sup>, EUA);
- Isoctano, acetona, n-hexano, todos Nanograde<sup>®</sup> (Mallinckrodt<sup>®</sup>, EUA);
- Acetato de etila UltimAR<sup>®</sup> (Mallinckrodt<sup>®</sup>, EUA);
- Metanol ChromAR<sup>®</sup> (Mallinckrodt<sup>®</sup>, EUA);
- Formaldeído p.a. 37% (Merck<sup>®</sup>, Brasil);
- Solução de limpeza Extran<sup>®</sup> alcalino (Merck<sup>®</sup>, Brasil);
- Água purificada (destilada, desionizada);
- Acetona p.a. (Vetec<sup>®</sup>, Brasil).

#### **3.2 Equipamentos e materiais**

- Cromatógrafo a Gás Varian 3800 (EUA) equipado com: amostrador automático

- (autosampler) Varian 8100; injetor 1079 modo split/splitless com insersor (*liner*) de vidro silanizado, diâmetro interno (d.i.) de 2 mm (*part number* 03-918466-00); detector por captura de elétrons, isótopo  $^{63}\text{Ni}$ ; sistema de aquisição de dados através do Workstation Star 4.5 (Varian, EUA); controlador eletrônico de fluxo (EFC, do inglês *Electronic Flow Control*);
- Coluna capilar DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme (J & W Scientific<sup>®</sup>, EUA);
  - Balança analítica de precisão, com quatro casas decimais, modelo AG 245 (Mettler Toledo<sup>®</sup>, Suíça);
  - Micropipetadores automáticos de capacidade variável (Brand<sup>®</sup>, Alemanha);
  - Cartuchos para SPE Strata C18-E, 500 mg/3 mL e 200 mg/3 mL (Phenomenex<sup>®</sup>, EUA);
  - Sistema para pré-concentração SPE, com capacidade de preparação de 20 amostras simultâneas (Varian<sup>®</sup>, EUA);
  - Bomba peristáltica multi-canais, modelo 5100 (Skalar<sup>®</sup>, Holanda);
  - Dialisador de fibras capilares em polissulfona para uso em hemodiálise, modelo Hemoflow F5<sup>®</sup> (Fresenius Medical Care<sup>®</sup>, Alemanha);
  - Dialisador de fibras capilares em acetato de celulose para uso em hemodiálise, modelo CA 170<sup>®</sup> (Baxter Healthcare Corporation<sup>®</sup>, Japão);
  - Mangueiras de tygon<sup>®</sup> (Technicon C<sup>®</sup>, EUA);
  - Conectores de polipropileno para mangueiras, modelo 6365-90 (Cole-Parmer Instrument Company<sup>®</sup>, EUA);
  - Vidraria comum de laboratório.

### 3.3 Gases empregados no Cromatógrafo a Gás

- Gás de arraste: Hélio 99,999% de pureza (White Martins<sup>®</sup>, Brasil);
- Gás de *make up* do ECD: Nitrogênio 99,999% de pureza (White Martins<sup>®</sup>, Brasil);
- Gás para o amostrador automático: Nitrogênio 99,99% (Air Products<sup>®</sup>, Brasil).

### 3.4 Limpeza do material utilizado

A vidraria empregada na execução deste trabalho foi inicialmente borrifada com álcool comercial, enxaguada em água corrente e, em seguida, deixada em contato com solução de Extran<sup>®</sup> alcalino 5% (v/v) por, no mínimo, 6 h. Após este período os materiais foram lavados com água destilada/deionizada, seguido de lavagem com acetona p.a. e secos à temperatura ambiente. Os materiais limpos foram então armazenados em armário fechado.

### 3.5 Pesticidas selecionados e preparo das soluções

Os pesticidas selecionados para este estudo estão listados na Tabela 3, juntamente com o grau de pureza dos padrões de referência, massas e volumes utilizados para o preparo das soluções estoque em n-hexano (concentração 1000 mg L<sup>-1</sup>) de cada princípio ativo.

**Tabela 3.** Princípios ativos com os respectivos graus de pureza, massas e volumes utilizados para o preparo das soluções estoque em n-hexano (todas as soluções com concentrações finais de 1000 mg L<sup>-1</sup>).

Pesticida	Grau de pureza (%)	Massa (mg)	Volume (mL)
$\alpha$ -Endosulfan	97,0	10,3	10
$\beta$ -Endosulfan	99,0	10,1	10
DDE	99,0	10,1	10
DDT	99,0	10,1	10
Endrin	85,4	11,7	10

Como as substâncias utilizadas como padrão de referência possuem pureza abaixo de 100%, efetuou-se a correção das pesagens, conforme recomenda a literatura [58] para a obtenção das soluções estoque individuais, em n-hexano, na concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (soluções 1).

A solução estoque contendo a mistura de todos os pesticidas foi preparada através da dissolução em acetato de etila de uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  da solução estoque de cada pesticida em estudo em balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$ , resultando em uma concentração final de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (solução 2). Esta foi armazenada em frasco de vidro âmbar e estocada a temperatura de  $-17 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Diariamente, preparava-se uma solução com concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (solução analítica 3), em acetato de etila, a partir de um volume de  $100 \mu\text{L}$  da solução 2 em balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$ , para obtenção das soluções analíticas no mesmo solvente, conforme mostra a Tabela 4.

**Tabela 4.** Preparo das soluções analíticas, em acetato de etila, obtidas a partir da solução analítica nº 3 ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Nº da solução	Volume utilizado da solução 3 ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ )	Volume final (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
4	$50 \mu\text{L}$	10	0,5
5	$50 \mu\text{L}$	5	1,0
6	$250 \mu\text{L}$	5	5,0
7	1 mL	10	10,0
8	1 mL	5	20,0
9	3 mL	10	30,0
10	2 mL	5	40,0
11	1 mL	2	50,0

### **3.6 Seleção do Padrão Interno**

Foram preparados 10 mL de solução estoque dos princípios ativos aldrin e clorotalonil separadamente, em concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>, utilizando como solvente n-hexano e acetato de etila, respectivamente. Estes princípios ativos, em concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, foram testados como padrão interno (PI). Para este teste, 10 µL de cada solução foi adicionada a 1 mL das soluções analíticas contidas em vial, imediatamente antes das injeções no cromatógrafo a gás. O PI foi selecionado de acordo com a sensibilidade, resolução e tempo de retenção. Neste estudo, o PI foi empregado apenas com o intuito de acompanhar a estabilidade da resposta do sistema cromatográfico.

### **3.7 Estudo das condições cromatográficas**

Em métodos cromatográficos existem alguns parâmetros importantes a serem seguidos a fim de se obter maior eficiência, sensibilidade e seletividade na separação de compostos. A seguir serão descritos os parâmetros avaliados neste trabalho.

#### **3.7.1 Estudo da vazão ótima do gás de arraste**

Para selecionar a melhor vazão a ser empregada na separação cromatográfica dos compostos em estudo, injetou-se a solução analítica de nº 3 (0,1 mg L<sup>-1</sup>) contendo o PI selecionado conforme procedimento descrito no item 3.6, em diferentes vazões, sendo elas: 1,9; 2,4 e 2,7 mL min<sup>-1</sup>. A vazão ótima foi determinada através da construção da curva de van Deemter para cada pesticida em estudo. De acordo com o fabricante da coluna, a vazão ótima para o gás de arraste deve ser ≤ 5 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.7.2 Condições de operação do detector ECD

O gás nitrogênio foi usado como *make up* do detector ECD, sendo sua vazão mantida constante em 30 mL min<sup>-1</sup>, conforme recomendações do fabricante do cromatógrafo a gás. O detector foi mantido a temperatura de 300 °C.

### 3.7.3 Sistema de injeção

Uma mistura dos solventes isoctano e tolueno (9:1, v/v) foi utilizada como solvente para limpeza da seringa do amostrador automático. O carregamento da seringa consistiu na aspiração de 0,5 µL de solvente, 0,5 µL de ar e então 1 µL da solução a ser analisada. A velocidade de injeção foi de 0,5 µL s<sup>-1</sup>. O injetor foi mantido a temperatura de 240 °C, com insersor de 2 mm de diâmetro interno.

A válvula *split/splitless* do injetor operou de acordo com a seguinte programação:

- inicial: aberta (1:50)
- 0,01 s: fechada
- 0,80 s: aberta (1:50)
- 2,00 s: aberta (1:20);

### 3.7.4 Coluna cromatográfica e programa de temperatura do forno da coluna

A seleção da coluna cromatográfica depende, principalmente, da natureza dos pesticidas a serem separados. Para avaliar a separação dos compostos organoclorados foi utilizada uma coluna capilar de fase polarizável DB-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme, com rampas de aquecimento do forno da coluna conforme disposto na Tabela 5. Empregou-se a solução analítica n° 3 (0,1 mg L<sup>-1</sup>) para estes testes.

**Tabela 5.** Programas de temperatura do forno da coluna utilizados na otimização da separação cromatográfica.

Método (M)		Temperatura (°C)	Rampa (°C min <sup>-1</sup> )	Tempo mantido (min)	Total da corrida (min)
M1	Inicial	50	–	1,00	1,00
	1	200	15	0,00	11,00
	2	280	7	0,00	22,43
	3	300	15	0,24	24,00
M2	Inicial	80	–	1,00	1,00
	1	200	15	0,00	9,00
	2	280	7	0,00	20,43
	3	300	15	2,24	24,00
M3	Inicial	80	–	1,00	1,00
	1	200	15	0,00	9,00
	2	280	8	0,00	20,43
	3	290	15	2,90	24,00
M4	Inicial	80	–	1,00	1,00
	1	200	15	0,00	9,00
	2	280	10	0,00	17,00
M5	Inicial	80	–	1,00	1,00
	1	200	20	0,00	7,00
	2	280	8	0,00	17,00



### 3.7.5 Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros cromatográficos empregados para avaliar a separação cromatográfica dos pesticidas foram: fator de retenção ( $k$ ), resolução ( $R_s$ ) e fator de separação ( $\alpha$ ). Estes parâmetros foram calculados a partir dos cromatogramas obtidos com a injeção da solução analítica n° 3 (0,1 mg L<sup>-1</sup>), utilizando as equações definidas no item 2.7.

Cada composto foi identificado injetando-se, inicialmente, soluções analíticas contendo cada princípio ativo separadamente, na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, avaliou-se a mistura contendo todos os princípios ativos (solução analítica n° 3), adicionada do PI. Todas as injeções foram feitas sob as mesmas condições cromatográficas, observando-se e confirmando-se o tempo de retenção de cada composto.

O tempo de retenção de um analito não retido, também conhecido como tempo morto ( $t_M$ ), é obtido pela análise de um composto não retido na coluna cromatográfica. Neste trabalho utilizou-se uma alíquota do *headspace* do solvente diclorometano injetado sob as mesmas condições cromatográficas estabelecidas para as demais análises.

### 3.8 Otimização do método de extração e pré-concentração dos pesticidas empregando SPE

O material adsorvente utilizado foi a sílica modificada com hidrocarboneto linear C18-E, disposto em tubos de 3 mL, contendo quantidades variadas do mesmo. Este material caracteriza-se por apresentar partículas de 55  $\mu\text{m}$ , área superficial de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, 17% de carbono total, sem capacidade de troca iônica.

Foram testados cartuchos contendo 200 e 500 mg de material adsorvente do tipo Strata C18-E, adquiridos da firma Phenomenex<sup>®</sup>, utilizando-se o sistema representado na Figura 6. O sistema comercial utilizado é composto por uma caixa de vácuo com capacidade de processamento de até 20 amostras

simultaneamente, o que é conveniente quando se trabalha com um número relativamente grande de amostras.



**Figura 6.** Sistema SPE utilizado para pré-concentração das amostras.

Quando se trabalha com extração em fase sólida é recomendada a otimização de quatro etapas a fim de se obter os melhores resultados [38]. Estas etapas estão demonstradas de forma esquemática na Figura 7, sendo elas as seguintes:

#### **a) Condicionamento do adsorvente**

Esta etapa destina-se a ativar o material existente dentro do cartucho; o solvente a ser empregado depende principalmente do material a ser ativado. No caso da sílica quimicamente modificada é necessária uma etapa de limpeza do material adsorvente com solvente orgânico, para remoção de possíveis sujidades, antes do condicionamento efetivo, ou seja, antes da preparação do adsorvente com o meio da amostra, neste caso, água. Isto é um pré-requisito para a adsorção reproduzível dos analitos e para remoção do solvente orgânico usado anteriormente. Um dos fatores mais importantes nesta etapa é não deixar que todo o solvente seja eliminado, para evitar a formação de caminhos preferenciais, comprometendo a separação.

### b) Aplicação da amostra

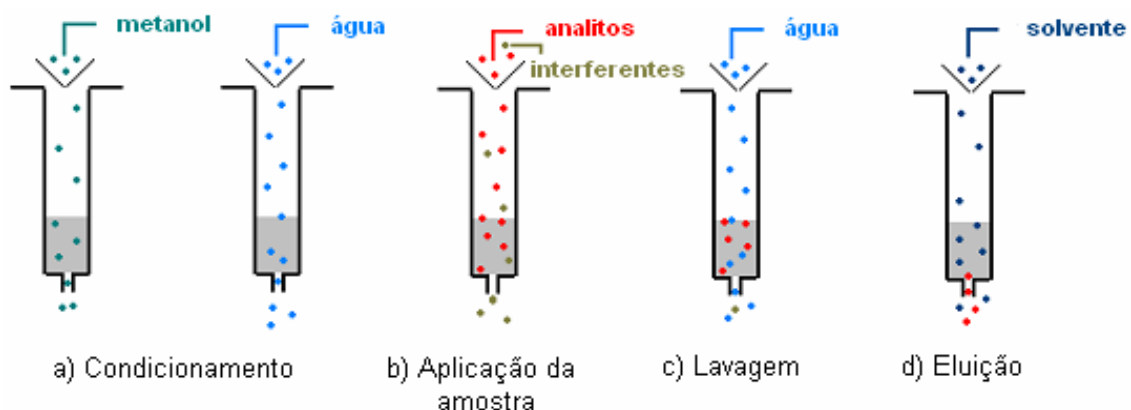
A fim de obter-se resultados reprodutíveis, a transferência da amostra deve ser quantitativa. A amostra é percolada, através do cartucho já condicionado, por pressão ou vácuo. Nesta etapa o ideal é que interferentes não sejam adsorvidos, escoando através do cartucho para o coletor de resíduos. Entretanto, esta é uma situação difícil de ser alcançada.

### c) Lavagem

Alguns interferentes da matriz são removidos com um pequeno volume de água ou água contendo pequena porcentagem de solvente orgânico que não possua força suficiente para remover os analitos.

### d) Eluição dos analitos retidos

Finalmente, os analitos são desorvidos e eluídos com um pequeno volume de solvente. Após esta etapa a análise cromatográfica deve ser realizada de imediato. O solvente deve ser seletivo o bastante para que a interação entre analito e adsorvente torne-se fraca e a distribuição do analito através do eluente ocorra. Portanto, para se fazer uma boa escolha do solvente são necessários conhecimentos prévios no que se refere à estrutura, polaridade, solubilidade e outras propriedades dos analitos [57].



**Figura 7.** Princípio de operação do sistema SPE.

### **3.8.1 Descrição do método de extração/pré-concentração**

O desenvolvimento desta etapa foi realizado, inicialmente, usando-se amostras de água destilada/desionizada fortificadas com quantidades conhecidas dos pesticidas em análise.

Para limpeza optou-se por passar através dos cartuchos de C18-E, 3 mL de metanol, seguido do condicionamento com 3 mL de água destilada/desionizada. Após esta etapa, 100 mL de amostra são percolados pelo material adsorvente à uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup>. Em seguida, faz-se uma lavagem com 3 mL de água destilada/desionizada e submete-se os cartuchos ao vácuo, cerca de 30 min, para secagem.

Para a etapa de eluição foram feitos testes para escolha do melhor solvente, utilizando-se combinações dos solventes: acetato de etila, acetona, n-hexano e isoctano. Optou-se por eluição com 2 mL (duas porções de 1 mL) de uma mistura de solventes. Desta forma, obteve-se um fator de pré-concentração de 50 vezes.

### **3.9 Teste em branco**

Realizou-se o teste em branco para avaliar se os solventes e materiais utilizados em todo o processo apresentavam resíduos dos pesticidas e/ou interferências nos tempos de retenção dos princípios ativos em estudo. Para tal, foi realizado todo o procedimento de extração e pré-concentração utilizando-se água destilada/desionizada como amostra e posterior análise cromatográfica.

### **3.10 Validação do procedimento**

Definidas as melhores condições cromatográficas para a separação dos cinco pesticidas organoclorados e o método de extração/pré-concentração utilizando SPE, validou-se o procedimento proposto segundo os parâmetros descritos no item 2.8.

### 3.10.1 Curva analítica e linearidade

Os pesticidas em estudo foram quantificados utilizando-se o método da padronização externa. As curvas analíticas foram obtidas preparando-se misturas das soluções dos princípios ativos, em acetato de etila. Injetou-se no sistema GC-ECD, três vezes ( $n=3$ ), 1  $\mu\text{L}$  das soluções nº 4 a 11 (Tabela 4), obtendo-se as áreas e o tempo de retenção de cada um dos compostos com o auxílio do *software* Star<sup>®</sup> 4.5 (Varian).

### 3.10.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para determinar o LOD e o LOQ empregaram-se soluções analíticas em acetato de etila e amostras fortificadas.

Na determinação do LOD do instrumento foram feitas injeções em ordem crescente de concentração partindo-se de uma solução diluída em acetato de etila ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) até chegar a uma dada concentração onde as alturas dos picos foram três vezes superior em relação ao ruído da linha base nas proximidades do tempo de retenção dos picos de interesse. Já para o LOQ, injetou-se até atingir a concentração cuja altura dos picos foi dez vezes superior em relação ao ruído da linha base no tempo de retenção dos picos de interesse.

Já na determinação do LOD e do LOQ do procedimento, amostras fortificadas nas concentrações 0,012, 0,014, 0,016 e assim sucessivamente até  $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$ , num total de 10 amostras, foram submetidas ao método de extração/pré-concentração em cartuchos C18-E e injetadas no sistema cromatográfico. Foram obtidas as relações sinal-ruído conforme descrito para os limites instrumentais.

### 3.10.3 Recuperação

A avaliação da porcentagem de recuperação foi realizada através da fortificação de amostras de água destilada/desionizada (100 mL) com pequenos volumes (10, 20 e 100  $\mu\text{L}$ ) de uma solução analítica contendo 1  $\text{mg L}^{-1}$  dos padrões, em metanol, nos níveis de 0,1; 0,2 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, em triplicata. As amostras fortificadas foram submetidas ao método de SPE e então analisadas no sistema cromatográfico.

#### **3.10.4 Repetitividade**

A repetitividade da resposta do instrumento ( $\text{RSD}_{ri}$ ) foi avaliada efetuando-se injeções, em triplicata, das soluções analíticas nº 6, 7 e 11 (Tabela 4), contendo 5, 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas em estudo, respectivamente, no sistema cromatográfico.

A repetitividade do procedimento ( $\text{RSD}_{rp}$ ) foi avaliada efetuando-se a etapa de extração/pré-concentração e análise das amostras fortificadas nos mesmos três níveis avaliados no teste de recuperação. Cada nível de concentração foi extraído/pré-concentrado em triplicata e cada extrato, analisado três vezes.

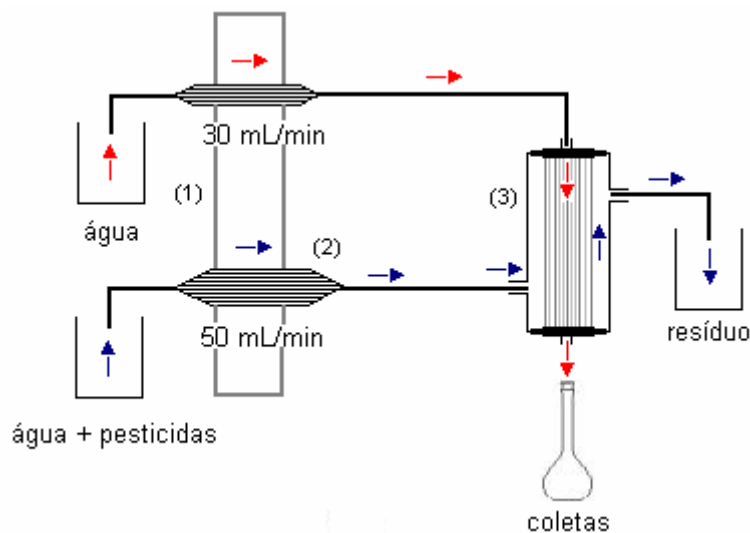
#### **3.10.5 Precisão intermediária**

O estudo da precisão intermediária da resposta do instrumento ( $\text{RSD}_{pii}$ ) foi realizado injetando-se em triplicata, no sistema cromatográfico, soluções analíticas com concentrações iguais às utilizadas no estudo de repetitividade, em dois dias diferentes.

Para o estudo da precisão intermediária do procedimento ( $\text{RSD}_{pip}$ ) efetuou-se o método de extração/pré-concentração e análise das amostras fortificadas nos mesmos três níveis avaliados no teste de recuperação. Cada nível de concentração foi extraído/pré-concentrado em triplicata e cada extrato analisado três vezes, em dois dias diferentes e com analistas diferentes.

### 3.11 Aplicação do procedimento

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do procedimento proposto foi adaptado, em escala laboratorial, um sistema de diálise representado esquematicamente pela Figura 8. Para isto fez-se uso de uma bomba peristáltica multicanais, onde através de mangueiras de tygon<sup>®</sup>, unidas por conectores plásticos, foram obtidas vazões com ordem de grandeza 10 vezes menor que as utilizadas em sessões reais de diálise.



- (1) bomba peristáltica;
- (2) mangueiras de tygon<sup>®</sup> unidas por conectores plásticos;
- (3) dialisador de fibras capilares.

**Figura 8.** Sistema de diálise utilizado para os estudos em escala laboratorial.

No processo original o sangue flui (sentido das setas vermelhas) a uma vazão de  $300 \text{ mL min}^{-1}$  por dentro dos capilares do dialisador, que são constituídos de membranas semipermeáveis. Em sentido contrário (sentido das setas azuis) flui água limpa na vazão de  $500 \text{ mL min}^{-1}$ . Desta forma, pequenas moléculas presentes no sangue e que não foram eliminadas corretamente pela urina passam para a água, sendo esta descartada e o sangue retornado ao paciente. Cada paciente possui um dialisador próprio, sendo que sua reutilização

é permitida. Para isso, o dialisador deve ser mantido em uma solução desinfetante, como por exemplo, solução aquosa de formaldeído a 4% (v/v) [3].

Neste trabalho, substituiu-se o sangue por água destilada/desionizada e adicionaram-se quantidades conhecidas dos pesticidas em estudo na água que passa em sentido contrário, com o intuito de avaliar se ocorre passagem destes analitos através das membranas dos dialisadores.

### **3.11.1 Procedimento de diálise realizado**

Para avaliar a segurança do processo de hemodiálise e o possível risco de contaminação a que os pacientes submetidos a este tipo de tratamento estão sujeitos ao se utilizarem águas contaminadas por pesticidas nas seções, foram simuladas seções de diálise, utilizando-se o sistema representado na Figura 8, da seguinte maneira:

a) Inicialmente, todo o sistema foi preenchido com água destilada/desionizada, mantendo-se a bomba peristáltica ligada por 10 min para remoção de qualquer resíduo de esterilizante utilizado pelo fabricante;

b) Esvaziou-se o sistema;

c) No sentido das setas vermelhas, a uma vazão de  $30 \text{ mL min}^{-1}$ , passou-se água destilada/desionizada e no sentido das setas azuis, a uma vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ , água fortificada com os pesticidas em estudo;

d) Os primeiros 100 mL que saíram dos capilares do dialisador foram descartados, sendo posteriormente coletadas 3 frações de 100 mL em balões volumétricos, as quais foram submetidas ao procedimento de pré-concentração e análise;

e) Esvaziou-se o sistema;

f) Preencheu-se os dois compartimentos e o dialisador com solução de formaldeído a 4% (v/v), mantendo-se a bomba peristáltica ligada até serem descartados os primeiros 100 mL;

g) Desligou-se a bomba mantendo-se o sistema em contato com a solução de limpeza por 30 min;



- h) Esvaziou-se o sistema;
- i) Lavou-se o sistema com água destilada/desionizada, mantendo-se com vazões constantes por 10 min;
- j) Repetiu-se o processo por mais duas vezes, sendo realizadas, portanto, 3 seções de diálise, cada uma com 3 coletas.

### **Observações importantes:**

- Foram testados dois tipos de dialisadores, compostos por capilares de diferentes materiais: um com membranas constituídas de acetato de celulose e outro de polissulfona.

- Foram avaliados dois níveis de contaminação na água fortificada para o experimento: 2 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (um experimento completo para cada nível). Estas concentrações foram obtidas tomando-se volumes de 0,2 e 2,0 mL, respectivamente, de uma solução 10  $\text{mg L}^{-1}$  dos cinco pesticidas organoclorados em metanol, para obter 1000 mL de solução.

- O emprego da solução de formaldeído a 4% (v/v) fez parte do processo para que a simulação realizada em laboratório fosse semelhante à situação real e também para avaliar se o processo de limpeza compromete a integridade das membranas, tornando-as mais permeáveis.

- No total, foram realizados quatro diferentes experimentos:

Experimento 1: com dialisador cujas membranas são constituídas de acetato de celulose, utilizando água fortificada ao nível de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

Experimento 2: com dialisador cujas membranas são constituídas de acetato de celulose, utilizando água fortificada ao nível de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

Experimento 3: com dialisador cujas membranas são constituídas de polissulfona, utilizando água fortificada ao nível de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

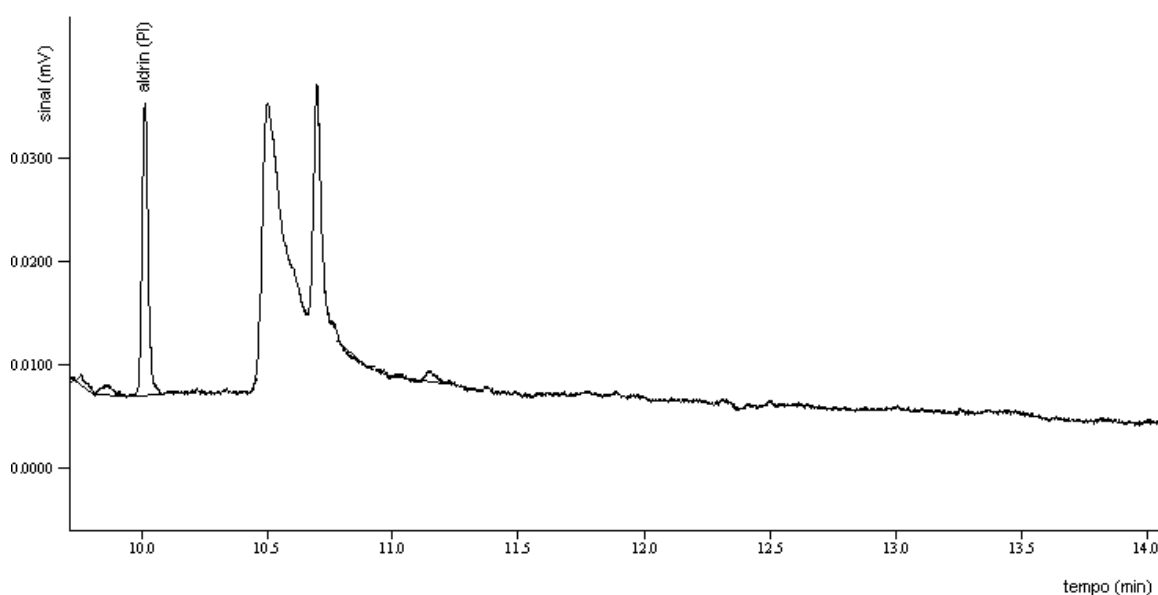
Experimento 4: com dialisador cujas membranas são constituídas de polissulfona, utilizando água fortificada ao nível de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ;

- Para cada experimento, 3 sessões de diálise, cada uma com 3 coletas de 100 mL. As alíquotas coletadas foram submetidas ao método de SPE otimizado e então analisadas no GC-ECD.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teste em branco

Para o teste em branco, o método de extração/pré-concentração utilizando SPE foi realizado apenas com água destilada/desionizada, sem a presença dos analitos, apenas com adição do PI, para avaliar se os solventes e materiais utilizados em todo o processo apresentavam interferências nos tempos de retenção dos princípios ativos em estudo. Posteriormente, realizou-se a análise cromatográfica. O cromatograma do teste em branco está representado na Figura 9. Mesmo havendo a presença de um sinal entre 10,5 e 11,0 min, este não representou interferências para os tempos de retenção dos compostos em estudo.



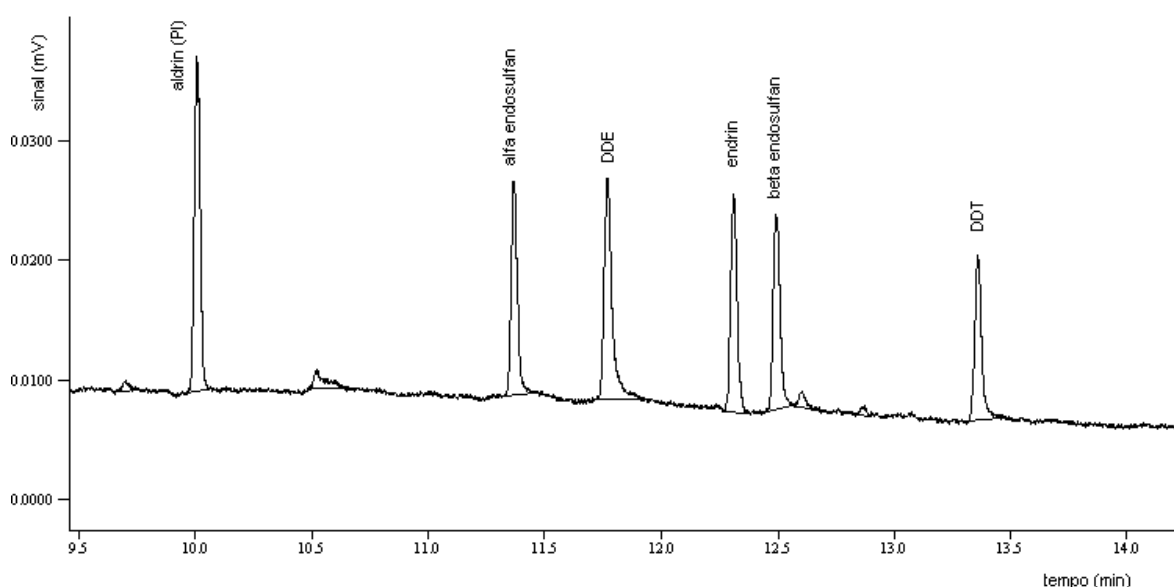
**Figura 9.** Cromatograma do teste em branco.

### 4.2 Avaliação das condições cromatográficas

O método escolhido para a programação de temperatura do forno da coluna foi o nº 5 (M5 – conforme Tabela 5) com temperatura inicial de 80 °C, rampa de

20 °C min<sup>-1</sup> até 200 °C, após rampa de 8 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C, num total de 17 min de separação cromatográfica.

A coluna capilar de sílica fundida e fase polarizável DB-5, com 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme proporcionou separação eficiente dos pesticidas em tempo relativamente rápido, não ocorrendo sobreposição de picos com a programação de temperatura utilizada, como demonstra a Figura 10.



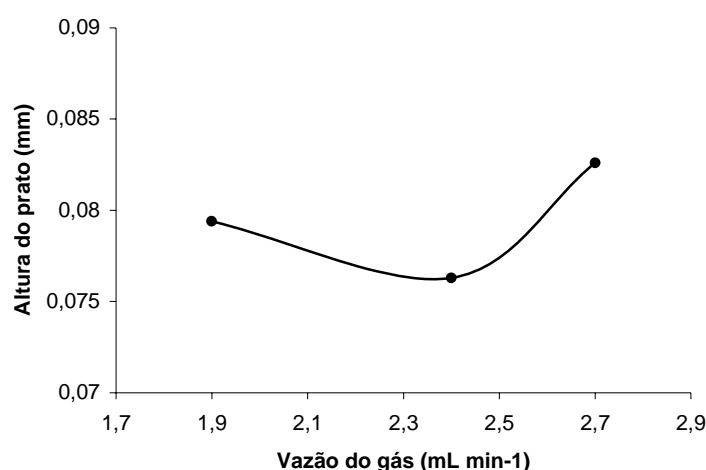
**Figura 10.** Cromatograma da solução analítica nº 6 (5 µg L<sup>-1</sup>) em acetato de etila, contendo os cinco pesticidas organoclorados em estudo e o PI selecionado (aldrin).

#### 4.2.1 Seleção do padrão interno

O pesticida clorotalonil foi avaliado como PI, mas não apresentou boa performance para as condições cromatográficas definidas para este estudo, apresentando cauda acentuada. Já o aldrin, por sua vez, apresentou boa resolução, não interferindo em nenhum dos tempos de retenção dos pesticidas em estudo, sendo assim, escolhido como PI.

#### 4.2.2 Escolha da vazão ótima do gás de arraste

A vazão ótima do gás de arraste foi obtida através da construção da curva de van Deemter, representada na Figura 11, conforme itens 2.7.4 e 3.7.1, sendo fixada em  $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Para os demais pesticidas, os resultados referentes a este item encontram-se no Apêndice B.



**Figura 11.** Curva de van Deemter para escolha da vazão ótima do gás de arraste, utilizando os valores encontrados para o  $\alpha$ -endossulfan.

#### 4.2.3 Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros  $t_R$ ,  $t_R'$ ,  $k$ ,  $R_s$  e  $\alpha$  foram utilizados para avaliar a separação cromatográfica. A Tabela 6 apresenta estes valores obtidos para a separação da mistura dos compostos e PI após análise cromatográfica da solução analítica nº 3. O tempo de saída do analito não retido ( $t_M$ ), como descrito no item 3.7.5 foi de 1,19 min.

De acordo com os dados da Tabela 6, observa-se que os valores de  $k$  são bons para todos os compostos, estando dentro dos intervalos ideais para múltiplos componentes, sendo aceitáveis valores de  $k$  entre 0,5 e 20.

Para  $\alpha$  obtiveram-se valores acima de 1 para todos os pares de compostos, o que é recomendado para separação entre dois picos adjacentes.

Os valores de **Rs** entre os pares de compostos comprovam uma boa separação. Rs maior que 1, como para o par endrin/ $\beta$ -endosulfan mostra uma separação maior que 98%. No caso de Rs maior que 1,25 tem-se 99,5% de separação, caso do par  $\alpha$ -endosulfan/DDE. Para os demais pares de compostos a separação obtida foi de 100% (Rs maior que 1,5). Desse modo, podem ser quantificados com segurança.

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos  $t_R$ ,  $t_R'$ ,  $k$ ,  $R_s$  e  $\alpha$  obtidos para a separação da mistura dos compostos e PI, empregando a solução analítica n° 3.

Pesticidas	$t_R$	$t_R'$	$k$	$R_s$	$\alpha$
Aldrin	10,01	8,82	7,39	–	–
$\alpha$ -Endosulfan	11,38	10,19	8,54	7,67	1,15
DDE	11,77	10,58	8,87	1,45	1,04
Endrin	12,31	11,12	9,32	2,25	1,05
$\beta$ -Endosulfan	12,49	11,30	9,47	1,16	1,02
DDT	13,36	12,17	10,20	5,04	1,07

### 4.3 Avaliação da etapa de extração

Testes preliminares para otimizar o método de SPE permitiram a escolha do cartucho para a pré-concentração e o solvente para eluição dos analitos retidos.

#### 4.3.1 Escolha do solvente para eluição

Com base em alguns dados da literatura [41, 43, 44, 46] foi verificado que o uso de um único solvente orgânico não produz resultados satisfatórios para a extração de pesticidas organoclorados devido às suas diferentes polaridades.

Então, foram realizados testes prévios em cartuchos C18-E (500 mg) para determinar uma mistura de solventes que produza as melhores recuperações, utilizando-se duas porções de 1 mL de cada mistura para eluição (volume final = 2 mL). Estes testes foram realizados em duplicata para os três níveis de fortificação (0,1; 0,2 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e os resultados obtidos estão nas Tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7.** Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:acetona para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).

Pesticida	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Proporções da mistura n-hexano:acetona		
		3:7 (v/v)	5:5 (v/v)	7:3 (v/v)
$\alpha$ -Endosulfan	0,1	92,1	95,3	98,7
	0,2	119,9	113,4	115,2
	1,0	108,7	112,6	106,8
DDE	0,1	63,4	48,7	62,8
	0,2	69,6	48,9	55,4
	1,0	68,3	51,2	53,1
Endrin	0,1	107,3	94,6	98,5
	0,2	120,7	97,9	105,9
	1,0	119,7	108,4	107,9
$\beta$ -Endosulfan	0,1	129,5	115,3	113,6
	0,2	124,2	105,8	109,4
	1,0	128,8	120,0	112,4
DDT	0,1	69,6	47,1	55,3
	0,2	68,7	51,8	59,8
	1,0	74,7	52,9	59,2

**Tabela 8.** Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:acetato de etila para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).

Pesticida	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Proporções da mistura n-hexano:acetato de etila		
		3:7 (v/v)	5:5 (v/v)	7:3 (v/v)
$\alpha$ -Endosulfan	0,1	69,1	87,6	107,9
	0,2	71,0	89,3	105,4
	1,0	72,9	91,6	108,3
DDE	0,1	36,4	47,2	86,4
	0,2	39,8	46,0	89,1
	1,0	40,8	47,2	86,7
Endrin	0,1	63,2	81,9	98,4
	0,2	64,6	84,7	95,2
	1,0	64,2	86,6	98,6
$\beta$ -Endosulfan	0,1	89,5	93,1	108,9
	0,2	90,3	95,6	104,5
	1,0	91,7	97,5	112,1
DDT	0,1	39,6	56,5	90,5
	0,2	42,9	57,1	96,3
	1,0	43,5	59,5	99,7



**Tabela 9.** Percentuais de recuperação médios referentes ao teste com a mistura de solventes n-hexano:isooctano para eluição dos pesticidas organoclorados pré-concentrados em cartuchos C18-E (500 mg).

Pesticida	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Proporções da mistura n-hexano:isooctano		
		3:7 (v/v)	5:5 (v/v)	7:3 (v/v)
$\alpha$ -Endosulfan	0,1	42,7	60,9	64,7
	0,2	48,9	58,6	68,2
	1,0	50,0	61,7	69,3
DDE	0,1	37,4	79,2	57,0
	0,2	33,0	78,1	49,1
	1,0	33,7	81,8	46,0
Endrin	0,1	8,4	12,4	9,3
	0,2	8,1	11,5	8,5
	1,0	7,8	10,9	9,5
$\beta$ -Endosulfan	0,1	3,5	6,4	5,0
	0,2	3,9	6,6	4,9
	1,0	4,3	6,8	5,1
DDT	0,1	26,1	69,4	41,6
	0,2	24,0	73,6	44,8
	1,0	36,0	85,9	51,9

Com base nestes resultados, a mistura de n-hexano e acetato de etila na proporção 7:3 (v/v) foi considerada como a melhor para a eluição, proporcionando recuperações satisfatórias para os três níveis de concentração avaliados, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos

cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas [62], os quais devem estar entre 85 e 115%.

#### **4.3.2 Escolha do melhor cartucho para pré-concentração**

Como a quantidade de analito adsorvida/recuperada depende da capacidade do material adsorvente (gramas do analito/grama de fase sólida), a quantidade necessária de adsorvente poderá variar de amostra para amostra.

Para este trabalho, baseando-se em informações da literatura e nas condições disponíveis em laboratório, foram testados cartuchos C18-E contendo 200 e 500 mg de material adsorvente. Os resultados desta etapa estão dispostos na Tabela 10.

Neste teste prévio, realizado em duplicata, a eluição foi feita com 2 mL (2 porções de 1 mL) da mistura de solventes n-hexano:acetato de etila (7:3, v/v), definida como a que melhor extrai os analitos retidos, conforme descrito no item 4.3.1.

Avaliando-se os resultados obtidos para este teste, os cartuchos de C18-E contendo 500 mg de adsorvente foram os que demonstraram melhores resultados, proporcionando recuperações satisfatórias para os três níveis de concentração avaliados, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas [62], os quais devem estar entre 85 e 115%, sendo, portanto, escolhidos para os demais experimentos de extração/pré-concentração realizados neste estudo.

**Tabela 10.** Resultados referentes ao teste para determinação da quantidade necessária de material adsorvente C18-E para a extração/pré-concentração dos pesticidas.

Pesticida	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	
		C18 (200 mg)	C18 (500 mg)
$\alpha$ -Endosulfan	0,1	94,97	106,63
	0,2	111,35	112,09
	1,0	102,58	108,85
DDE	0,1	68,75	86,34
	0,2	82,14	85,85
	1,0	81,39	90,33
Endrin	0,1	94,37	109,26
	0,2	111,85	109,85
	1,0	109,76	111,70
$\beta$ -Endosulfan	0,1	87,25	111,62
	0,2	114,75	111,90
	1,0	101,48	110,42
DDT	0,1	70,72	89,95
	0,2	83,56	94,08
	1,0	88,01	86,04

#### 4.4 Validação do procedimento desenvolvido

Definidas as melhores condições de separação para os compostos estudados e o método de extração/pré-concentração, o passo seguinte foi a validação da metodologia para análise, segundo os parâmetros descritos na seqüência. Os resultados obtidos serão apresentados a seguir.

##### 4.4.1 Curva analítica

A Tabela 11 apresenta as equações das curvas analíticas referentes a cada pesticida avaliado, bem como os coeficientes de determinação ( $r^2$ ).

**Tabela 11.** Curvas analíticas e coeficientes de determinação obtidos para os princípios ativos preparados em acetato de etila.

Pesticidas	Equação da reta $y = ax + b$	$r^2$
$\alpha$ -Endosulfan	$y = 457,72x + 1565,6$	0,9992
DDE	$y = 638,12x + 901,73$	0,9989
Endrin	$y = 494,49x + 633,38$	0,9997
$\beta$ -Endosulfan	$y = 404,11x + 859,92$	0,9990
DDT	$y = 453,41x + 1321,3$	0,9997

De acordo com as equações obtidas das curvas analíticas, o método é linear e adequado para os pesticidas avaliados. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) são maiores que 0,99, considerados satisfatórios para a análise de resíduos de pesticidas [63].

#### 4.4.2 Linearidade

No presente trabalho, considerou-se como faixa linear os pontos cujos valores de  $(S/Q)_i$  estão no intervalo  $1,0 \pm 0,05$ , ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular da reta (a). Os valores obtidos para as curvas analíticas evidenciaram linearidade satisfatória para os pesticidas avaliados na faixa entre 1 e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . As Tabelas contendo os dados referentes ao cálculo de linearidade para cada um dos compostos podem ser vistas no Apêndice A.

#### 4.4.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos de LOD e LOQ instrumental e do procedimento. Para facilitar a comparação, também encontram-se na Tabela 11 os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira [7].

**Tabela 12.** Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental ( $\text{LOD}_i$  e  $\text{LOQ}_i$ ), LOQ do procedimento ( $\text{LOQ}_p$ ) e LMRs estabelecidos pela legislação brasileira.

Pesticidas	$\text{LOD}_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{LOQ}_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{LOQ}_p$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LMRs ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
$\alpha$ -Endosulfan	0,3	1,0	0,020	20 <sup>a</sup>
DDE	0,2	0,7	0,014	2 <sup>b</sup>
Endrin	0,3	0,8	0,016	0,6
$\beta$ -Endosulfan	0,3	0,9	0,018	20 <sup>a</sup>
DDT	0,3	0,9	0,018	2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> e <sup>b</sup> limites referentes a soma dos isômeros

Os valores de LOD e LOQ para o instrumento e para o procedimento são satisfatórios, podendo-se considerar os resultados como sendo muito bons, uma

vez que desta maneira é possível analisar amostras de água com concentrações baixas de contaminantes, até mesmo em níveis menores que o permitido pela legislação brasileira, conforme disposto na Tabela 2, item 2.5.

#### 4.4.4 Repetitividade e precisão intermediária

A Tabela 13 apresenta a precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pii}$ ) do instrumento para a resposta, em termos de área, das soluções analíticas dos princípios ativos nas concentrações de 5, 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O teste de precisão intermediária foi realizado em dois dias diferentes, injetando-se três vezes cada padrão.

**Tabela 13.** Resultados de precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pii}$ ) do instrumento.

Pesticidas	$RSD_{ri}$		$RSD_{pii}$	
	faixa de variação	média	faixa de variação	média
$\alpha$ -Endosulfan	0,7 – 2,6	1,6	1,7 – 4,9	3,6
DDE	0,9 – 1,9	1,5	2,0 – 4,1	3,1
Endrin	0,8 – 2,6	1,7	4,2 – 4,9	4,6
$\beta$ -Endosulfan	0,8 – 4,9	2,6	2,1 – 6,0	4,3
DDT	1,9 – 2,9	2,3	2,5 – 5,5	4,2

Os resultados em termos de repetitividade e precisão intermediária do instrumento, obtidos para todas as concentrações avaliadas das soluções analíticas preparadas em solvente são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos aplicados a pesticidas [58], onde a precisão para valores de área deve ser  $\leq 5\%$ .

A Tabela 14 apresenta a precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{rp}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pip}$ ) do procedimento.

**Tabela 14.** Resultados de recuperação e precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{rp}$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pip}$ ) do procedimento.

Pesticida	Nível de fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	$RSD_{rp}$ (%)	Recuperação (%)	$RSD_{pip}$ (%)
$\alpha$ -Endosulfan	0,1	105,1	2,9	101,1	4,8
	0,2	111,0	2,2	104,8	3,7
	1,0	114,1	6,8	107,2	2,8
DDE	0,1	91,6	3,0	85,9	9,9
	0,2	85,4	3,0	85,4	3,0
	1,0	98,9	10,1	98,9	10,1
Endrin	0,1	105,2	2,0	99,4	3,5
	0,2	111,2	4,0	114,0	4,4
	1,0	111,1	7,2	111,7	0,8
$\beta$ -Endosulfan	0,1	112,1	1,7	104,7	5,5
	0,2	114,2	3,3	109,2	2,1
	1,0	113,6	7,0	108,1	2,2
DDT	0,1	89,2	0,9	92,2	11,9
	0,2	96,1	2,5	93,6	6,5
	1,0	104,8	9,4	99,2	3,8

A precisão do procedimento foi avaliada efetuando-se o método de extração/pré-concentração e análise das amostras fortificadas nos mesmos três níveis avaliados no teste de recuperação. Cada nível de concentração foi

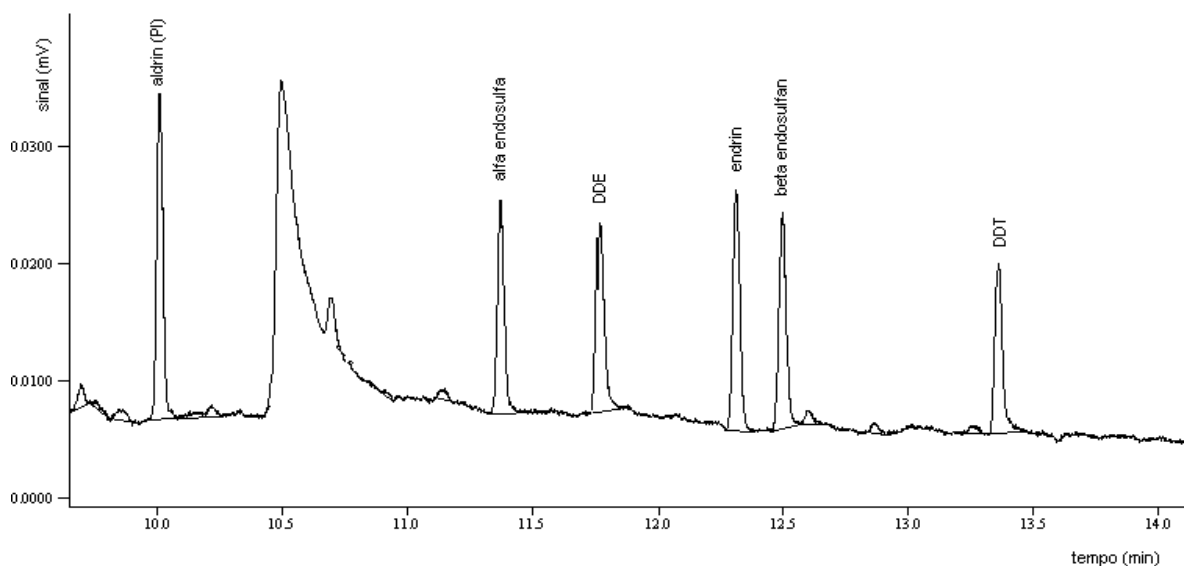
extraído/pré-concentrado em triplicata e cada extrato analisado três vezes. O teste de precisão intermediária foi realizado empregando analistas e dias diferentes.

#### 4.4.5 Recuperação

A Tabela 14 também apresenta os valores obtidos no teste de recuperação, com o respectivo RSD%, para fortificações em três diferentes níveis de concentração: 0,1; 0,2 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , representando 5, 10 e 50 vezes o maior valor de LOQ do procedimento (valor de LOQ<sub>p</sub> obtido para o  $\alpha$ -endossulfan).

Os resultados de recuperação dos compostos, empregando a curva analítica preparada em solvente para o cálculo, são satisfatórios para todos os níveis de concentração, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas [62], os quais devem estar entre 85 e 115%, com valores de RSD menores que 15%.

O cromatograma de uma amostra fortificada no nível 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  está representado na Figura 12.



**Figura 12.** Cromatograma de amostra fortificada ao nível de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  contendo os cinco pesticidas organoclorados em estudo e o padrão interno.



#### 4.5 Aplicação do procedimento desenvolvido

Foram realizados quatro experimentos conforme item 3.11.1, sendo os resultados obtidos apresentados nas Tabelas 15 a 18.

**Tabela 15.** Resultados (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Experimento 1).

Pesticidas	Diálise I			Diálise II			Diálise III		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
$\alpha$ -Endosulfan	nd	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endrin	nd	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
$\beta$ -Endosulfan	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DDT	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	nd	nd

nd = não detectado

< LOQ = valor menor que LOQ do procedimento

- = não avaliado

**Tabela 16.** Resultados (em ng L<sup>-1</sup>) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de 20 µg L<sup>-1</sup> (Experimento 2).

Pesticidas	Diálise I			Diálise II			Diálise III		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
α-Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endrin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
β-Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDT	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

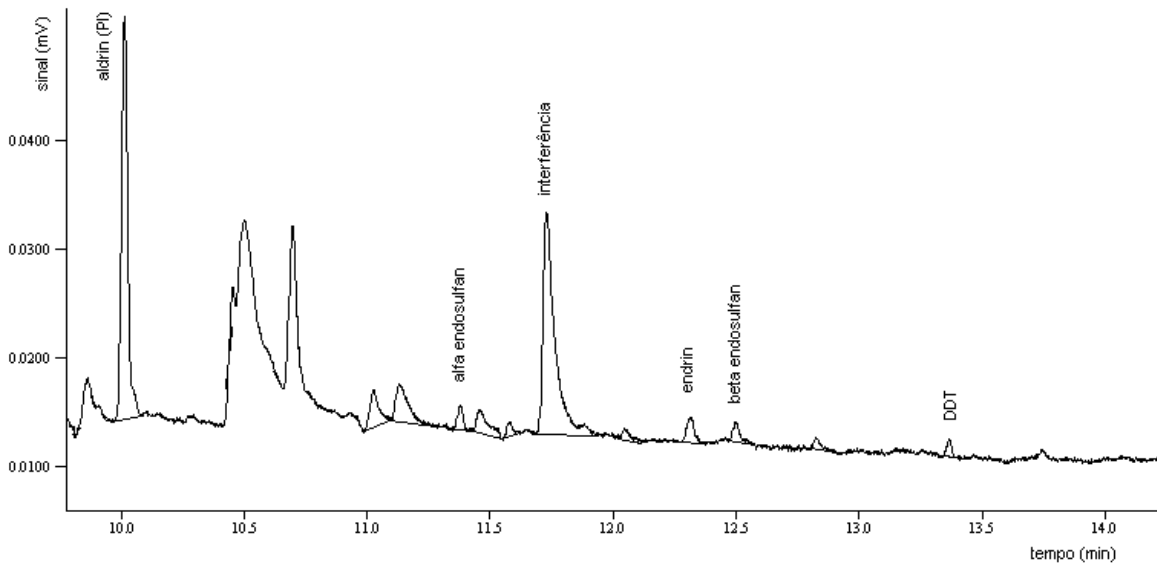
- = não avaliado

< LOQ = valor menor que LOQ do procedimento

Avaliando-se os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 pode-se observar que em ambos os experimentos (Experimentos 1 e 2 com dialisador de acetato de celulose) ocorreu a passagem de pesticidas para a água não contaminada, no entanto, em níveis tão baixos que não puderam ser quantificados (não atingiram os valores de LOQ do procedimento).

A análise dos cromatogramas obtidos quando realizados estes experimentos (1 e 2) revela uma interferência na determinação do pesticida DDE. Foi detectado um pico bastante acentuado próximo ao tempo de retenção deste analito, encobrendo seu sinal, o que impossibilitou sua avaliação. Possivelmente, este sinal seja devido a algum resíduo oriundo do próprio material do dialisador de acetato de celulose. Entretanto, este interferente não foi identificado.

Esta situação pode ser observada na Figura 13, que mostra o cromatograma obtido com a aplicação do experimento 2, diálise II, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de 20 µg L<sup>-1</sup>).



**Figura 13.** Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 2, diálise II, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de acetato de celulose e água fortificada ao nível de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Tabela 17.** Resultados (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Experimento 3).

Pesticidas	Diálise I			Diálise II			Diálise III		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
$\alpha$ -Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDE	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Endrin	< LOQ	26,5	32,9	< LOQ	32,1	17,0	16,6	33,0	63,9
$\beta$ -Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ

nd = não detectado

< LOQ = valor menor que LOQ do procedimento

**Tabela 18.** Resultados (em ng L<sup>-1</sup>) obtidos com a aplicação do procedimento de diálise, conforme item 3.11.1, utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de 20 µg L<sup>-1</sup> (Experimento 4).

Pesticidas	Diálise I			Diálise II			Diálise III		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
α-Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDE	< LOQ	< LOQ	< LOQ	15,5	19,5	20,9	26,7	14,1	19,1
Endrin	28,2	32,6	33,2	33,1	41,8	53,8	51,9	51,9	53,9
β-Endosulfan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
DDT	< LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = não detectado

< LOQ = valor menor que LOQ do método

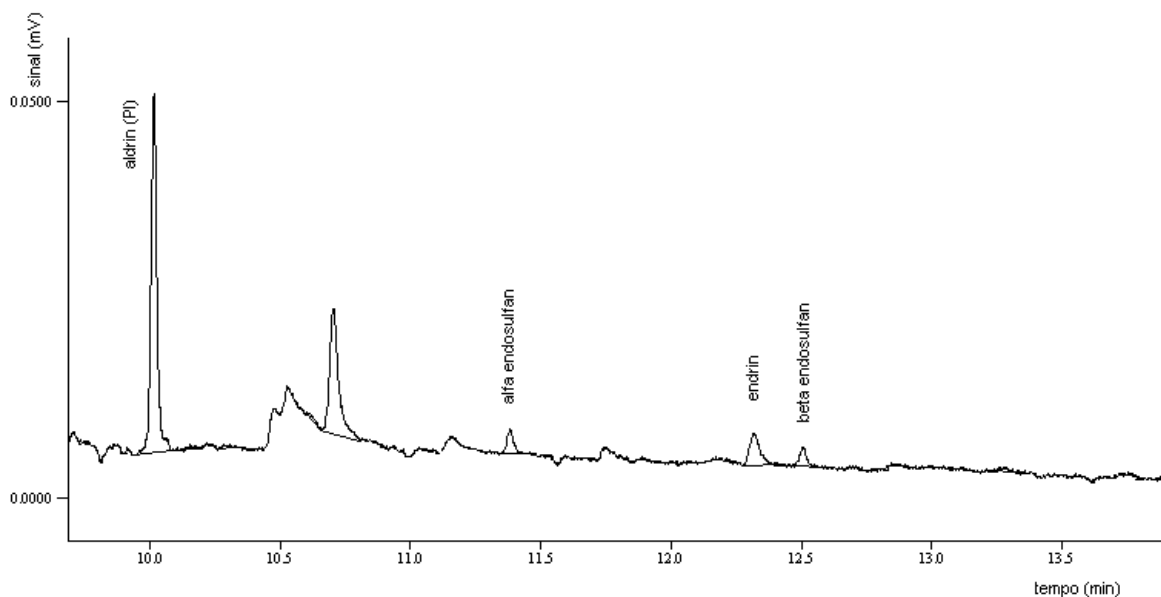
Quando usado o dialisador de polissulfona foi possível quantificar a presença do pesticida endrin no Experimento 3 (utilizando água fortificada ao nível de 2 µg L<sup>-1</sup>), como mostra a Tabela 17, cujos valores variaram entre 16,6 e 63,9 ng L<sup>-1</sup> e no Experimento 4 (utilizando água fortificada ao nível de 20 µg L<sup>-1</sup>), com dados dispostos na Tabela 18, sendo que as concentrações determinadas ficaram entre 28,2 e 53,9 ng L<sup>-1</sup>.

Já o pesticida DDE atingiu valores de concentração maiores que o LOQ do procedimento apenas no Experimento 4, sendo que estas variaram entre 14,1 e 26,7 ng L<sup>-1</sup>. Levando-se em conta o fato de que em cada sessão de hemodiálise o volume de água utilizado é de 120 L, sendo que esta entra em contato direto com o sangue dos pacientes, estes poderiam estar expostos a cerca de 1,7 a 3,2 µg deste pesticida a cada dia de tratamento dialítico. Sabendo-se que são realizadas 3 sessões semanais, estes fatos tornam-se muito importantes se forem considerados casos de pacientes que fazem uso desta terapia durante anos. Portanto, a qualidade da água que é utilizada em clínicas de hemodiálise deve ser

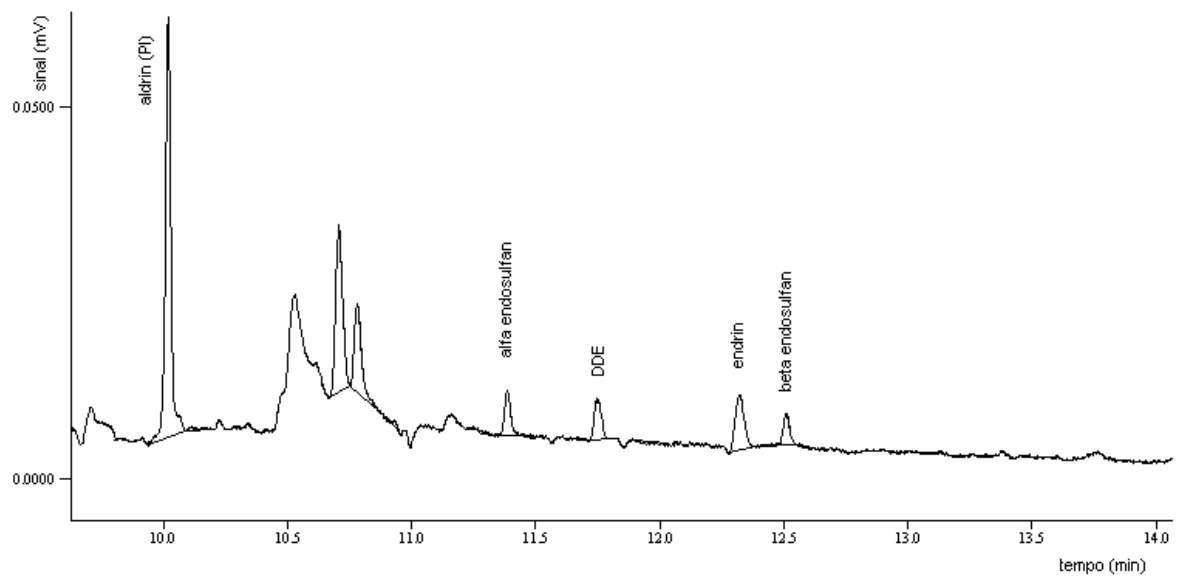
constantemente monitorada, em especial quanto a presença de resíduos de pesticidas devido ao fato de que estes compostos apresentam efeitos cumulativos.

O aumento da permeabilidade das membranas com a prática de reutilização dos dialisadores através do uso de soluções de limpeza pode ser observado neste estudo quando considerados os resultados obtidos para o pesticida endrin nos Experimentos 3 e 4, uma vez que foi obtida uma ordem crescente de concentração deste pesticida passando-se da diálise I para as diálises II e III, sucessivamente.

Para ilustrar os Experimentos 3 e 4 são apresentados nas Figuras 14 e 15 alguns cromatogramas adquiridos através da aplicação do procedimento desenvolvido.



**Figura 14.** Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 3, diálise II, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



**Figura 15.** Cromatograma obtido com a aplicação do experimento 4, diálise III, coleta 2 (utilizando dialisador com membranas de polissulfona e água fortificada ao nível de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

## 5 CONCLUSÕES

Um dos determinantes da segurança do tratamento dialítico utilizado por pacientes renais é a qualidade da água empregada no processo de hemodiálise. Como o volume de água utilizada em cada sessão é muito grande, cerca de 360 L por semana, a presença de contaminantes pode comprometer a saúde dos pacientes que se submetem a este tipo de tratamento.

Neste contexto, o procedimento desenvolvido e validado no presente trabalho é uma contribuição para a análise de pesticidas organoclorados em águas, possibilitando a determinação, por GC-ECD, dos compostos  $\alpha$  e  $\beta$ -endosulfan, DDE, DDT e endrin em níveis de 20 ng L<sup>-1</sup>, através de um procedimento de extração/pré-concentração de 100 mL de amostra em cartuchos de C18 (500 mg) com eluição realizada por 2 mL de uma mistura de n-hexano:acetato de etila na proporção 7:3 (v/v), o que proporciona um fator de pré-concentração de 50 vezes.

Estes contaminantes químicos, mesmo presentes em baixas concentrações, devem ser monitorados uma vez que se caracterizam por alta persistência e efeitos cumulativos.

Com este trabalho também foi avaliada a capacidade de tais pesticidas em atravessar as membranas semipermeáveis de dialisadores utilizados em hemodiálise e os resultados mostram que esta situação ocorre quando realizado o procedimento de diálise proposto, em escala laboratorial. Embora não se possa afirmar que este comportamento seja igual em uma situação real, os resultados constituem um indicativo de que os pacientes que utilizam o tratamento dialítico podem estar propensos a desenvolver complicações devido a uma possível contaminação da água utilizada nas clínicas de hemodiálise.

Portanto, é necessário o monitoramento contínuo da água utilizada em sessões de diálise para que os pacientes possam realizar o tratamento que necessitam de maneira segura e eficaz.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

---

- Aplicar o procedimento desenvolvido a outras classes de pesticidas;
- Avaliar um maior número de diálises, em mesmo dialisador (considerando que a reutilização é permitida até 12 vezes);
- Analisar amostras de água empregada em clínicas de hemodiálise para verificar a possibilidade de ocorrência de resíduos de pesticidas;
- Realizar um estudo interdisciplinar de avaliação de risco, considerando fatores como propriedades físico-químicas dos pesticidas avaliados, características individuais dos pacientes (teor de gordura, massa corporal), número de sessões de diálise, patogenicidades desenvolvidas e então relacioná-las entre si.



## 7 REFERÊNCIAS

---

1. SILVA, A. M. M., MARTINS, C. T. B., FERRABOLI, R., *et al.*, **J. Bras. Nefrol.**, 18 (1996) 180-188.
2. LEME, I. L., SILVA, V. G., **Recomendações para a garantia da qualidade da água tratada para uso em unidades de hemodiálise**, disponível em <http://www.abcdt.org.br/conteúdo/destaque.asp>, acessado em 22/06/2004.
3. Brasil. **Portaria nº 2.042**, Ministério da Saúde (11 de outubro de 1996). Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Terapia Renal Substitutiva e as normas para cadastramento desses estabelecimentos junto ao Sistema Único de Saúde.
4. Brasil. **Portaria nº 82**, Ministério da Saúde (3 de janeiro de 2000). Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise e as normas para cadastramento desses junto ao Sistema Único de Saúde.
5. Brasil. **Portaria nº 36**, Ministério da Saúde (19 de janeiro de 1990). Aprova as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano.
6. Brasil. **Portaria nº 1.469**, Ministério da Saúde (29 de dezembro de 2000). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
7. Brasil. **Portaria nº 518**, Ministério da Saúde (25 de março de 2004). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e

vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

8. JAIN, C. K., ALI, I., **Inter. J. Environ. Anal. Chem.**, 68 (1997) 83-101.
9. TOLOSA, I., READMAN, J. W., MEE, L. D., **J. Chromatogr. A**, 725 (1996) 93-106.
10. [http://www.baxter.com.br/renal\\_pro-fisio.htm](http://www.baxter.com.br/renal_pro-fisio.htm), acessado em 22/06/2004.
11. GILMAN, A., **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª ed., Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill, 1996, 501-522p.
12. HOENICH, N. A., STAMP, S., **Biomaterials**, 21 (2000) 317-324.
13. [http://www.baxter.com.br/pdf/folheto\\_dp.pdf](http://www.baxter.com.br/pdf/folheto_dp.pdf), acessado em 15/07/2004.
14. [http://www.baxter.com.br/pdf/folheto\\_hd.pdf](http://www.baxter.com.br/pdf/folheto_hd.pdf), acessado em 15/07/2004.
15. [http://www.baxter.com.br/renal\\_hemo.htm](http://www.baxter.com.br/renal_hemo.htm), acessado em 22/06/2004.
16. HOENICH, N. A., STAMP, S., ROBERTS, S. J., *et al.*, **Biomaterials**, 18 (1997) 1299-1303.
17. HOENICH, N. A., VIENKEN, J., WOFFINDIN, C., **Biomaterials**, 16 (1995) 587-592.
18. <http://www.basf.de/basf/htm/plastics/english/pages/konstr/ultraso.htm>, acessado em 15/07/2004.
19. [http://www.jsao.bcasj.org.jp/main\\_about06.jsao.bcasj.or.jp/images/dialyser\\_custmodel\\_s.jpg](http://www.jsao.bcasj.org.jp/main_about06.jsao.bcasj.or.jp/images/dialyser_custmodel_s.jpg), acessado em 15/07/2004.

20. [http://www.hemofarm.com/proizvodi/em\\_materijal.htm](http://www.hemofarm.com/proizvodi/em_materijal.htm), acessado em 15/07/2004.
21. Brasil. **Resolução RDC nº 154**, Ministério da Saúde (15 de junho de 2004). Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise.
22. LOGANATHAN, B.G. E KANNAN, K., **Ambio**, 23 (1994) 187-191. *Apud* HONG, H., CHEN, W., XU, L., *et al.*, **Mar. Pollut. Bullet.**, 39 (1999) 376-382.
23. WILLIS, G.H., MCDOWELL, L.L, HARPER, *et al.*, **J. Environ. Qual.** 12 (1983) 80-85.
24. PRIMEL, E. G., **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação do Herbicida Clomazone em Água de Superfície Utilizando SPE e HPLC-UV**, 86 f. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2000.
25. SANTOS, S., REZENDE, M.O.O., LANDGRAF, M.D., *et al.*, **Anais Assoc. Bras. Quím.**, 50(2) (2001) 50-58.
26. D'AMATO, C., TORRES, J. P. M., MALM, O., **Quím. Nova**, 25 (2002) 995-1002.
27. MAGDIC, S., PAWLISZYN, J. B., **J. Chromatogr. A.**, 723 (1998) 111-122.
28. ZHANG, G., MIN, Y.S., MAI, B.X., *et al.*, **Mar. Pollut. Bullet.**, 39 (1999) 326-330.
29. BRANCO, S. M., **Natureza e Agroquímicos**. 15<sup>a</sup> ed., Coleção Desafios, São Paulo: Ed. Moderna, 2000, 56 p.

30. CARSON, R., **Primavera Silenciosa**, São Paulo: Ed. Melhoramentos, 1975, 79 p.
31. BAIRD, C., **Química Ambiental**, 2<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002, 622 p.
32. ALMEIDA, W.S., **Intoxicações acidentais humanas por inseticidas**. São Paulo, Instituto Biológico de São Paulo, nº 12, 1960.
33. WARE, G. W., **The Pesticide Book**, Califórnia: Thomson Publications, 1998, 144 p.
34. LARINI, L., **Toxicologia dos Praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999, 230 p.
35. SARKAR, A., NAGARAJAN, R., CHAPHADKAR, S., *et al.*, **Water Res.**, 31(2) (1997) 195-200.
36. RAWN, D., LOCKHARDT, F.K, LYLE, W., *et al.*, **Sci. Total Environ.**, 280 (2001) 17-37.
37. VALCÁRCEL, M., COLUMÉ, A., CÁRDENAS, S., *et al.*, **Talanta**, 54 (2001) 943-951.
38. LANÇAS, F. M., **Extração em fase sólida (SPE)**, São Paulo: Ed. Rima, 2004, 96 p.
39. VISI, E., KÁROLY, G., GYÖRFI, L., *et al.*, **J. Chromatogr. Sci.**, 39 (2001) 325-331.
40. BELTRAN, J., LÓPEZ, F. J., HERNÁNDEZ, F., **Anal. Chim. Acta**, 283 (1993) 297-303.

41. TRISKA, J., **Chromatographia**, 40 (1995) 712-717.
42. PATSIAS, J., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E., **J. Chromatogr. A.**, 740 (1996) 83-98.
43. VIANA, E., REDONDO, M. J., MOLTÓ, J. C., **J. Chromatogr. A.**, 733 (1996) 267-274.
44. EL-KABBANY, S., RASHED, M. M., ZAYED, M. A., **J. Hazard. Mater.**, 72 (2000) 11-21.
45. COUPE, R. H., MANNING, M. A., FOREMAN, W. T., *et al.*, **Sci. Total Environ.**, 248 (2000) 227-240.
46. BATISTA, S., SILVA, E., GALHARDO, S., *et al.*, **Inter. J. Environ. Anal. Chem.**, 82 (2002) 601-609.
47. HUASHEND, H., ZULIN, Z., XINHONG, W., *et al.*, **Mar. Pollut. Bullet.**, 45 (2002) 397-402.
48. SIMAL-GÁNDARA, J., LÓPEZ-BLANCO, M. C., BLANCO-CID, S., *et al.*, **J. Chromatogr. A.**, 984 (2003) 245-252.
49. GOUFINOPOULOS, S. K., VAGI, M. C., LEKKAS, D. T., *et al.*, **Chemosphere**, 50 (2003) 507-516.
50. MARCÉ, R. M., BROSSA, L., BORRUL, F., *et al.*, **J. Chromatogr. A.**, 998 (2003) 41-50.
51. NAMIÉŠNIK, J., WOLSKA, L., ZYGMUNT, B., **Chemosphere**, 53 (2003) 561-569.

52. SAPOTA, G., **Desalination**, 162 (2004) 153-157.
53. YU G., ZANG, Z., HUANG, J., *et al.*, **Environ. Pollut.**, 130 (2004) 249-261.
54. FATOKI, O. S., AWOFOLOU, O. R., **J. Environ. Sci. Health B**, 39 (2004) 101-114.
55. LANÇAS, F. M., **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Paulo: Ed. Acta, 1993, 254 p.
56. COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 6ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 279 p.
57. PRIMEL, E. G., **Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**, 170 f. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, RS, 2003.
58. GARP, Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, 1999.
59. TOMLIN, C., **The e-Pesticide Manual**, The British Crop Protection Council  
Versão eletrônica 2.0, 2000.
60. ZANELLA, R., PRIMEL, E. G., GONÇALVES, F. F., *et al.*, **J. Chromatogr. A** 904 (2000) 257-262.
61. CHASIN, A. A., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L. M., *et al.*, **Rev. Bras. Toxicol.**, 11 (1998) 1-6.
62. CAUSON, R., **J. Chromatogr. B**, 689 (1997) 175-180.

63. PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. **Quím. Nova** 19 (1996) 268-277.
64. MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem do capingüí, RS, empregando GC-ECD e GC-MS**, 208 f. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2003.
65. ETTRE, L. S. **Pure & Appl Chem.**, 65 (1993) 852.
66. RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H. et al., Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, **Quím. Nova** 27 (2004) 771-780.
67. CLIFTON, E. M. In MELOAN, C. E., (Ed). **Pesticides Laboratory Training Manual**, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 484 p., 1996.

## 8 APÊNDICES



## APÊNDICE A

Teste de linearidade, descrito no item 4.5.2.

**Tabela 1.** Dados referentes ao cálculo de linearidade para o inseticida  $\alpha$ -endosulfan.

$\alpha$ -Endosulfan	$y = 457,72x + 1565,5$					$r^2=0,9992$
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1	5	20	40	50	
Área média	2077,0	3946,7	10627,3	19472,0	24799,7	
S/Q	111,7	104,0	107,2	97,8	101,5	

**Tabela 2.** Dados referentes ao cálculo de linearidade para o inseticida DDE.

DDE	$y = 638,12x + 901,73$					$r^2=0,9989$
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1	5	20	40	50	
Área média	1544,3	4438,0	13323,0	25873,0	33352,7	
S/Q	103,1	107,6	107,7	97,8	101,8	

**Tabela 3.** Dados referentes ao cálculo de linearidade para o inseticida endrin.

Endrin	$y = 494,49x + 633,38$					$r^2=0,9997$
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1	5	20	30	50	
Área média	1172,3	3276,3	10251,0	15384,0	25499,3	
S/Q	109,0	106,9	97,2	99,4	100,6	

**Tabela 4.** Dados referentes ao cálculo de linearidade para o inseticida  $\beta$ -endosulfan.

$\beta$ -Endosulfan	$y = 404,11x + 859,92$					$r^2=0,9990$
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1	5	20	40	50	
Área média	1219,7	3094,3	8819,0	16649,0	21394,7	
S/Q	89,0	110,6	98,5	97,7	101,6	

**Tabela 5.** Dados referentes ao cálculo de linearidade para o inseticida DDT.

DDT	$y = 453,41x + 1321,3$					$r^2=0,9997$
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1	5	10	30	50	
Área média	1678,0	3452,0	6128,7	14921,0	23954,3	
S/Q	78,7	94,0	106,0	100,0	99,8	

## APÊNDICE B

Resultados referentes ao item 4.2.2 para escolha da vazão ótima do gás de arraste.

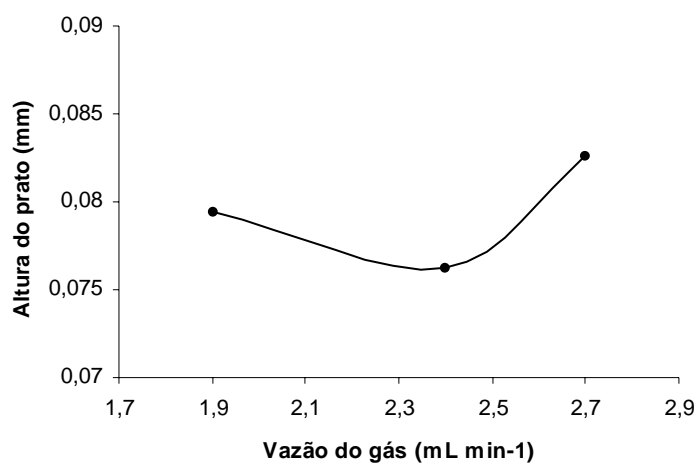


Figura 1. Curva de van Deemter para o pesticida  $\alpha$ -endosulfan.

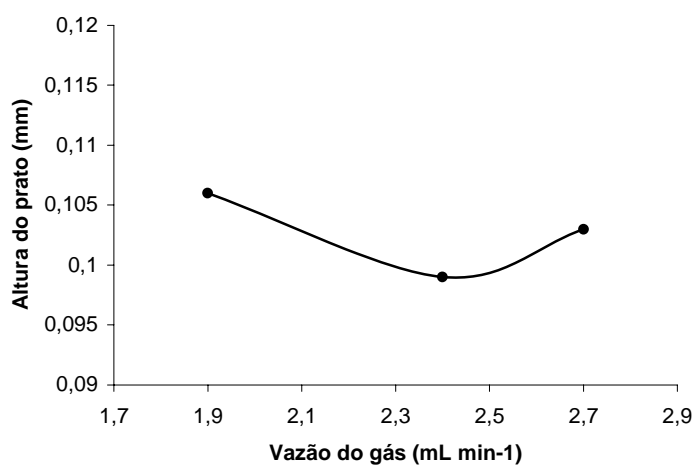
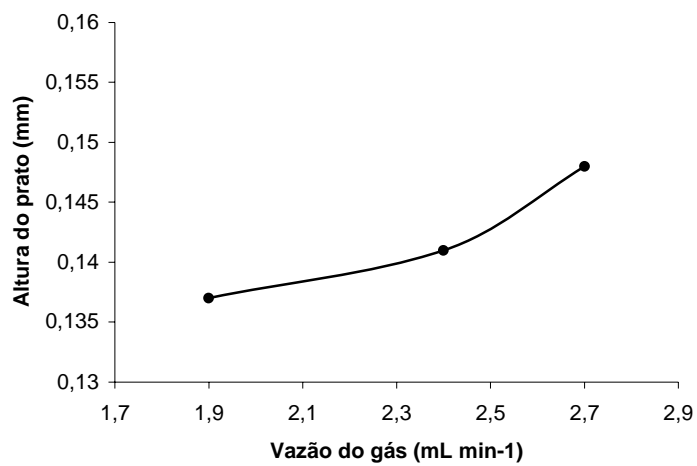
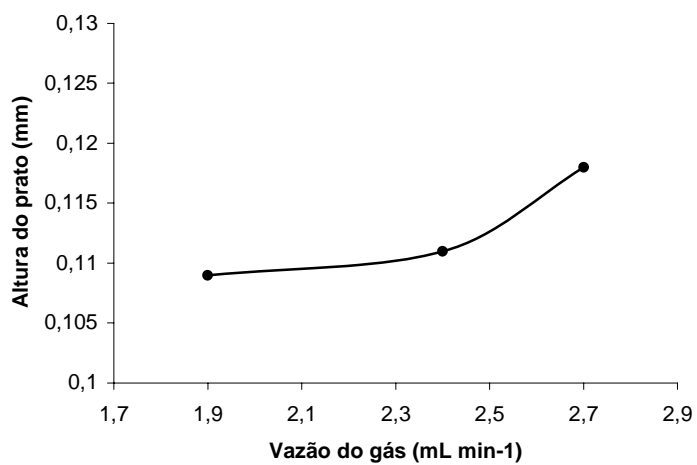


Figura 2. Curva de van Deemter para o pesticida  $\beta$ -endosulfan.



**Figura 3.** Curva de van Deemter para o pesticida DDT.



**Figura 4.** Curva de van Deemter para o pesticida DDE.

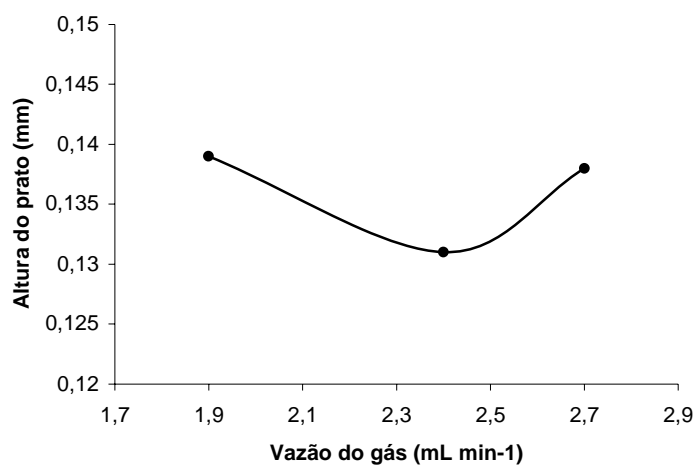


Figura 5. Curva de van Deemter para o pesticida endrin.